



Aus dem Institut für Anatomie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin



DISSERTATION

**Axonale Zielfindung im Hippocampus während der Entwicklung und nach
Läsion:
Analyse membran-assoziiierter Faktoren für die Schichtenspezifität
aussprossender Fasern**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Herrn Nicolai E. Savaskan

aus Berlin

den 20. Oktober 2001

Meinen Freunden
&
Für Gabriela und Engin

Dekan: Prof. Dr. med. J. Dudenhausen

1. Gutachter: Prof. Dr. med. R. Nitsch Berlin

2. Gutachter: Prof. Dr. rer.nat. K. Krieglstein Göttingen

3. Gutachter: Prof. Dr. med. M. Frotscher Freiburg i. Breisgau

Datum der Promotion: Berlin, den 13. Mai 2002

VORWORT

Durch Schädel-Hirn- und Rückenmarksverletzungen kommt es zum Verlust von axonalen Verbindungen und damit von Synapsen in nachgeschalteten Hirnregionen. Bei der Alzheimer'schen Erkrankung stellt sich in der Frühphase ein Untergang der Neurone des entorhinalen Cortex dar und im Verlauf eine Beteiligung des Hippocampus und der temporo-parietal corticaler Regionen (Braak und Braak, 1990, 1993). Obgleich diesen Erkrankungen eine ganz unterschiedliche Pathogenese zugrunde liegen und deren klinischer Verlauf sehr verschieden ist, haben sie alle morphologisch den Verlust axonaler Verbindungen gemein, der ursächlich für das klinische Bild ist. Die Komplexität des zentralen Nervensystems (ZNS) besteht also nicht allein in der grossen Anzahl seiner Nervenzellen, sondern vielmehr in den sinnvollen hochspezifischen Verbindungen zueinander. Mit Ramon y Cajals epochalen Arbeiten zur Entwicklung des zentralen Nervensystems wurde evident, dass die axonale Konnektivität im ZNS hochspezifisch ist und einer räumlich-zeitlichen Ordnung unterliegt. Seitdem haben sich Wissenschaftler der zugrundeliegenden Mechanismen der axonalen Verschaltung über das Studium von Auswuchsprozessen während der Entwicklung genähert und seit Mitte der 90er Jahre des letzten Jahrtausends wurden Moleküle mit axonaler Wegfindungsaktivität identifiziert. Basierend auf diesen Erkenntnissen entstand das Modell der axonalen Wegfindung, die über Distanz als auch über direkten Kontakt des Axons mit seiner Zielstruktur vermittelt werden kann.

Die vorliegende Arbeit versteht sich als Beitrag zur Bedeutung membran-assoziiierter, also kontaktabhängiger Faktoren in der axonalen Wegfindung im entorhino-hippocampalen System. Vor dem Hintergrund der aktuellen Diskussion zur Transplantation und Stammzelltherapie im ZNS stellt sich die Frage, in welchem Maße die Schichten- und Zielspezifität, also die Grundlage der spezifischen Konnektivität, im adulten ZNS in der Reorganisationsphase besteht und welche Faktoren daran beteiligt sind, dass eine verlorengegangene Verbindung wiederhergestellt werden kann. Zur Regeneration im adulten ZNS reicht es also nicht aus, untergegangene Neurone durch neue zu ersetzen, dies würde allenfalls zu einer *Functio laesio*, jedoch zu keiner *Restitutio ad integrum* führen. Vielmehr ist die Wiederherstellung der durch den Untergang der Neurone verlorenen Faserverbindungen zur Aufrechterhaltung der synaptischen Verbindung entscheidend. Es wäre also eine Spezifität zu fordern, die hinsichtlich der morphologischen und damit auch der funktionellen Konsequenzen der Situation vor Schädigung gleicht. Es ist zu hoffen, dass die vorliegende Untersuchung und daraus folgende einen Beitrag zum Verständnis der Reorganisationsprozesse im ZNS leisten und damit Ansätze zur Therapie/Intervention bieten.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente wurden mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 515/ A5, DFG SK 49-3, Graduiertenkolleg GRK 238 und DFG-Schwerpunktprogramm Selenoproteine 1087) gefördert.

Teile dieser Arbeit wurden publiziert in:

Brauer AU, **Savaskan NE***, Koole MH, Plaschke M, Monteggia LM, Nestler EJ, Simburger E, Deisz RA, Ninnemann O, Nitsch R.

Molecular and functional analysis of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the hippocampus after entorhinal cortex lesion.

FASEB J 2001, 15, 2689-2701.

Savaskan NE & Nitsch R.

Molecules involved in reactive sprouting in the hippocampus following perforant path lesion.

Rev Neurosci. 2001, 12: 195-215.

Brauer AU, **Savaskan NE***, Plaschke M, Ninnemann O, Nitsch R.

Perforant path lesion induces upregulation of stathmin mRNA, but not SCG10 mRNA, in the adult rat hippocampus.

Neuroscience 2001, 102 (3): 515-526.

Savaskan NE, Eyupoglu IY, Brauer AU, Plaschke M, Ninnemann O, Nitsch R, Skutella T.

Entorhinal cortex lesion studied with the novel dye fluoro-jade.

Brain Research 2000 May 2;864(1):44-51.

Savaskan NE, Skutella T, Brauer AU, Plaschke M, Ninnemann O, Nitsch R.

Outgrowth-promoting molecules in the adult hippocampus after perforant path lesion.

Eur J Neuroscience 2000 Mar;12(3):1024-32.

Stein E, **Savaskan NE***, Ninnemann O, Nitsch R, Zhou R, Skutella T.

A role for the Eph ligand ephrin-A3 in entorhino-hippocampal axon targeting.

J Neuroscience 1999; 19(20):8885-93.

Skutella T, **Savaskan NE***, Ninnemann O, Nitsch R.

Target- and maturation-specific membrane-associated molecules determine the ingrowth of entorhinal fibers into the hippocampus.

Developmental Biology 1999 Jul 15;211(2):277-92.

Savaskan NE, Plaschke M, Ninnemann O, Spillmann AA, Schwab ME, Nitsch R, Skutella T.

Myelin does not influence the choice behaviour of entorhinal axons but strongly inhibits their outgrowth length in vitro.

Eur J Neuroscience 1999 Jan;11(1):316-26.

**contributed equally as first author*

INHALTSVERZEICHNIS

VORWORT (Auszug der Publikationen)	4
LISTE VERWENDETER ABKÜRZUNGEN	9
1. EINLEITUNG	
1.1 Der Hippocampus in der Grundlagenforschung	11
1.2 Das Läsionsparadigma: Die Läsion des entorhinalen Cortex	12
1.3 Ein sequestrierter Prozess im Hippocampus nach entorhinaler Cortex Läsion	15
1.4 Mechanismen axonaler Wegfindung während der Entwicklung	16
1.5 Membran-assoziierte Moleküle nach entorhinaler Cortex Läsion	19
2. AUFGABENSTELLUNG UND EXPERIMENTELLE VERSUCHSANORDNUNG	
2.1 Fragestellung dieser Arbeit	21
2.2 <i>In vitro</i> Assays in der zellbiologischen Forschung	22
2.3 <i>In vitro</i> Assays zum Studium membran-assoziiierter Faktoren	23
2.4 Der Streifenassay und der Längenauswachsassay	24
3. MATERIAL UND METHODEN	
3.1 Tiere und stereotaktische Operation	26
3.2 Methodologische Überlegungen	26
3.2.1 Fluoro-Jade (FJ) Färbung und AChE-Histochemie	27
3.3 Präparation der Explantate	27
3.4 Membran- und Myelinpräparation	27
3.5 Streifenassay, Längenauswachsassay und Explantatkultivierung	29
3.6 Analyse des Streifen- und Auswachsassays	29
3.7 Immunohistochemische Nachweisverfahren zur Darstellung von Myelin	30
3.8 Mikroskopische Datenerfassung und Bildgebungsverfahren	31

4.	ERGEBNISSE	
4.1	Streifenassay und repulsive Faktoren	32
4.2	Das Auswachsen entorhinaler Axone ist abhängig vom Zielgebiet	32
4.3	Das Auswachsen entorhinaler Axone ist abhängig von der Maturation seines Zielgebiets, des Hippocampus	34
4.4	Myelin hat einen starken inhibitorischen Effekt auf die axonale Auswachslänge	36
4.5	Myelin beeinflusst nicht das axonale Auswahlverhalten	39
4.6	Der Einfluss von Membranen deafferenzierter Hippocampi auf das gerichtete axonale Auswachsen	40
4.7	Auswachslängen entorhinaler Axone auf Membranen deafferenzierter Hippocampi	41
4.8	Phospholipasebehandlung von Membranen adulter Hippocampi fördert das axonale Längenwachstum	44
4.9	Entorhinale Axone zeigen keine Präferenz zwischen postnatalen und adulten hippocampalen Membranen 10 Tage nach Läsion	45
5.	DISKUSSION	
5.1	Synopsis	47
5.2	Membran-assoziierte Moleküle während der Entwicklung	47
5.3	Myelin und axonale Elongation	49
5.4	Zielgerichtetes axonales Auswachsen nach Läsion	50
5.5	Reaktive Astrozyten und Extrazelluläre Matrix Moleküle nach Läsion	51
5.6	Axonales Aussprossen und Regeneration?	52
6.	ZUSAMMENFASSUNG	55
7.	SUMMARY	57
8.	LITERATURVERZEICHNIS	59
9.	DANKSAGUNG	73

VERÖFFENTLICHUNGEN	76
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	78

LISTE VERWENDETER ABKÜRZUNGEN

Bei der Verwendung von Abkürzungen wurde zum Teil auf die in der Literatur geläufige angelsächsische oder lateinische Version zurückgegriffen, soweit es keine deutsche Entsprechung gab. In Klammern findet sich die deutsche Übersetzung.

A:	adult
Abb.:	Abbildung
AChE:	Acetylcholin-Esterase
AG:	Astroglia
Ak:	Antikörper
Bp:	base pair
BSA:	bovine serum albumine (Rinderserum-Albumin)
IML:	innere Molekularschicht
CA:	Cornu ammonis
C/A:	commissurale/assoziations Fasern
CAM:	cell adhesion molecule (Zelladhäsionsmolekül)
cDNA:	copy desoxyribonucleic acid (Kopie Desoxyribonucleinsäure)
DAB:	Diaminobenzidin
dal:	days after lesion
DG:	dentate gyrus (Gyrus dentatus)
DNA:	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonucleinsäure)
E:	embryonal
EC:	Entorhinaler Cortex
ECL:	Entorhinale Cortex Läsion
ECM:	Extrazelluläre Matrix
EST:	expressed sequence tags
FJ:	Fluoro-Jade
GPI:	Glycosylphosphatidylinositol
IgSF:	immunoglobulin supergen family
MAG:	Myelin assoziiertes Glycoprotein
mAK:	monoklonaler Antikörper
MBP:	Myelin Basic Protein

MG:	Mikroglia
mRNA:	messenger ribonucleic acid (Boten Ribonucleinsäure)
N:	Neuron
OML:	äussere Molekularschicht
P:	postnatal
PBS:	phosphate-buffered saline
PCR:	polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PFA:	Paraformaldehyd
PI-PLC:	phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C
PP:	perforant pathway (Tractus perforans)
SLM:	Stratum lacunosum moleculare
SO:	Stratum oriens
SR:	Stratum radiatum
ZNS:	zentrales Nervensystem

1. EINLEITUNG

1.1 Der Hippocampus in der Grundlagenforschung

Der dem Archipallium phylogenetisch abstammende Hippocampus ist die zentrale Struktur und Schaltzentrale des limbischen Systems. Der isocortikale Informationsfluss erreicht die hippocampale Formation über den entorhinalen Cortex. Dessen efferente Projektion stellt der Tractus perforans dar, der eine der Hauptafferenzen zum Hippocampus bildet, und dessen Axone im Gyrus dentatus und im Ammonshorn enden (Ramon y Cajal, 1911; Amaral & Witter, 1989; Braak & Braak, 1993). Der Name dieses Traktes resultiert aus der Tatsache, dass entorhinale Fasern auf dem Weg zum Hippocampus das Subiculum 'perforieren'. Bei neurodegenerativen Erkrankungen wie z.B. dem Morbus Alzheimer oder der Temporallappen-Epilepsie zeigt sich ein früher Befall des entorhinalen Cortex (Braak & Braak, 1990, Van Hoesen et al., 1991; Du et al., 1995). Die klinische Relevanz und die relativ einfache Cytoarchitektur mit ihrer klaren Laminierung haben das entorhino-hippocampale System für entwicklungsbiologische Fragestellungen und De- und Regenerationsstudien als Modellsystem prädestiniert (Nitsch, 1993; Frotscher et al., 1995, 1997). Die Diskonnektion des Hippocampus durch den Untergang entorhinaler Projektionsneurone führt zu den schweren Gedächtnisstörungen bei der Alzheimer'schen Erkrankung (Hyman et al., 1984). In einem tierexperimentellen Modell kann diese Situation durch den wissenschaftskonzeptionell alten Ansatz der mechanischen Schädigung (Goltz, 1869, in Breidbach, 1997) nachgeahmt werden. Die stereotaktische Läsion des entorhinalen Cortex (ECL) ist ein weit verbreitetes und etabliertes Modell zur Untersuchung von Degenerations- und Reorganisationsprozessen im zentralen Nervensystem (ZNS) (Lynch et al., 1973; Parnavelas et al., 1974; Frotscher et al., 1997). Vergleichbar zu anderen fokalen Schädigungsmodellen im ZNS induziert die ECL komplexe zelluläre Reaktionen in

1. den Regionen, die direkt geschädigt wurden
2. in den Regionen, die um die primären Schädigung liegen
3. in den Ursprungsregionen, die axotomiert wurden und in denen retrograde Degenerationsprozesse ablaufen
4. in den denervierten Hirnarealen, die synaptischen Input verloren haben und anterograde Degenerationsprozesse ablaufen.

Obgleich sich die Forschung gleichermassen auf allen vier Regionen konzentriert, liegt in dieser Untersuchung der Schwerpunkt auf der deafferenzierten Hirnregion, die nicht direkt mechanisch geschädigt ist. In diesem Areal kommt es zur sequentiellen Aktivierung von

Mikroglia und Astrozyten, transneuronaler Degeneration und läsionsinduziertem Aussprossen von nichtlädierten Nervenfasern (Cajal, 1929; Hirsch & Bähr, 1999; Steward, 1989; Tello, 1911).

1.2 Das Läsionsparadigma: Die Läsion des entorhinalen Cortex

Eine charakteristische Eigenschaft der hippocampalen Organisation ist die schichten-spezifische Termination afferenter Fasern. Das Arrangement von Neuronen in Schichten ist ein Charakteristikum von kortikaler Organisation. Es ist seit längerem bekannt, dass diese Schichten durch eine sequenzielle Migration von postmitotischen Neuroblasten entlang richtungsgebender radialer Gliafasern zu ihren Zielgebieten geführt werden (Rakic, 1971). Diese laminäre Organisation von Neuronen und Fasern ist weniger komplex im phylogenetisch älteren Archicortex als in neocorticalen Arealen. Im Hippocampus sind die Prinzipalneuronen in einzelnen Schichten angeordnet. Wegen dieser relativ einfachen, trilaminären Organisation, der präzisen schichtenspezifischen Innervation und seiner klinischen Relevanz z. B. bei der Alzheimer Erkrankung wurde der Hippocampus als Modellsystem zur Untersuchung für postläsionale Degenerationen und Reorganisationen im adulten ZNS verwendet (Cabalka et al., 1992; Cotman et al., 1990; Frotscher et al., 1997; Price et al., 1998; Steward, 1989). Die Hauptafferenzen des Hippocampus sind entorhinale, septale und kommissurale/assoziative (C/A) Fasersysteme (Abb. 1A). Diese Projektionen terminieren in einer schichten-spezifischen Weise im Gyrus dentatus (DG) und in den CA Regionen. Axone aus dem entorhinalen Cortex verlaufen im Tractus perforans und enden in den distalen 2/3 der Molekularschicht (OML) des Gyrus dentatus (Axone des medialen entorhinalen Cortex projizieren in die mittlere, Axone des lateralen entorhinalen Cortex projizieren in die äussere Molekularschicht) und ins Stratum lacunosum-moleculare (slm) der CA1-CA3 Region (Steward & Scoville, 1976; Amaral & Witter, 1989). Die C/A Faserprojektion terminiert schichten-spezifisch in der inneren Molekularschicht des Gyrus dentatus und im Stratum radiatum der CA1-CA3 Region (Super & Soriano, 1994; Abb. 1 A).

Zur Elimination des entorhinalen Inputs sind bisher drei Techniken in der Literatur beschrieben worden (Kelley & Steward, 1997):

1. elektrolytische Läsion des entorhinalen Cortex
2. Aspiration des entorhinalen Cortex und
3. die mechanische Durchtrennung des Tractus perforans.

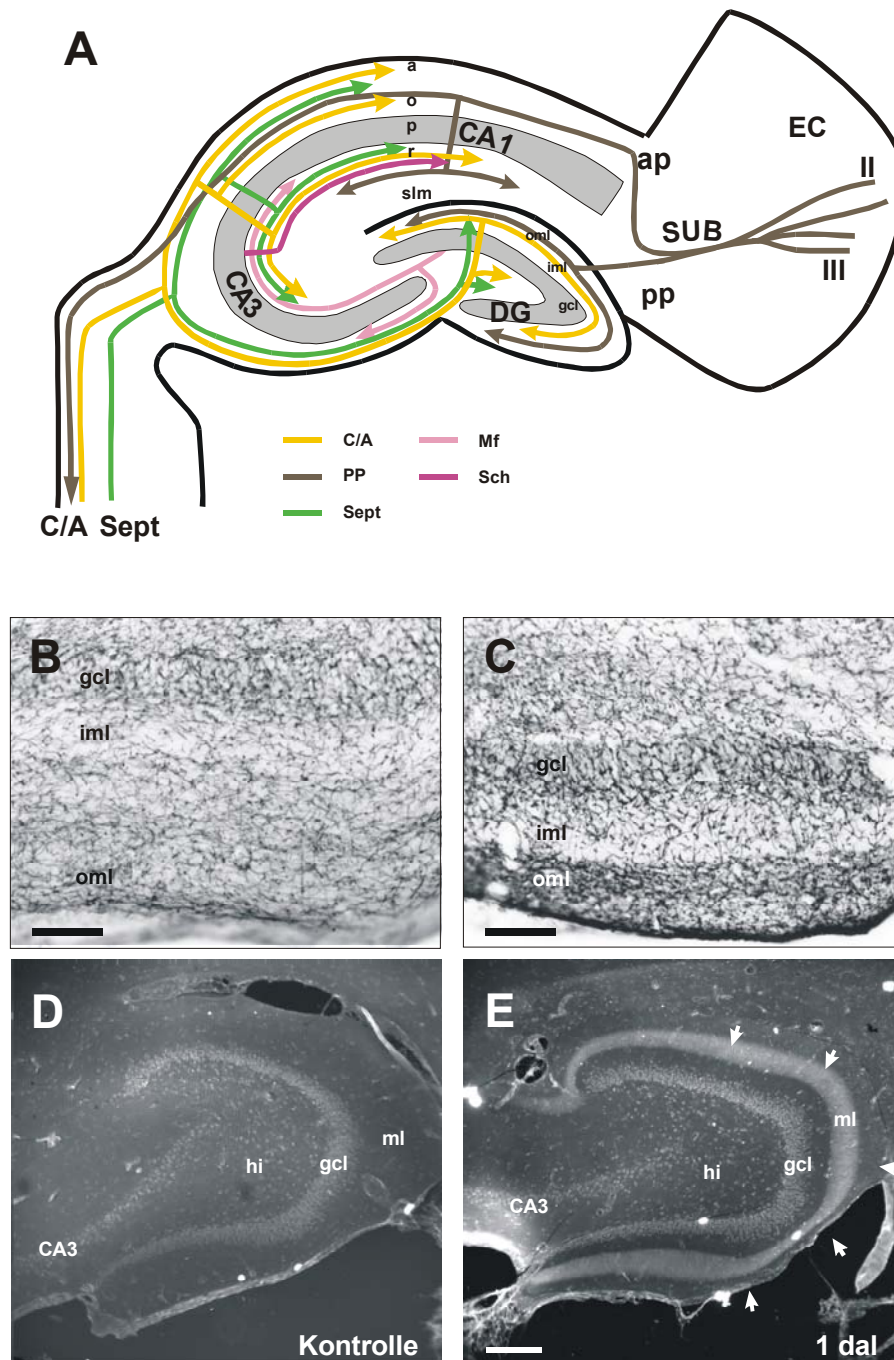


Abb.1:

Schema der axonalen Verschaltung im entorhino-hippocampalen System (A). Die in braun gezeichneten Fasern entspringen von Nervenzellen des entorhinalen Cortex (EC) aus Schicht II und III und terminieren schichten-spezifisch im Hippocampus, d.h. in der äusseren Molekularschicht (oml) des Gyrus dentatus (DG) sowie im Stratum lacunosum-moleculare (slm) des Cornu ammonis (CA). Commissurale und assoziative (C/A, gelb) sowie septale Afferenzen (Sept, grün) projizieren in den Hippocampus via der Fimbria und terminieren ebenfalls schichtenspezifisch. Nach einer Durchtrennung des Tractus perforans (pp) kommt es zu einer schichtenspezifischen anterograden Degeneration in der äusseren Molekularschicht (E, Pfeile) und ein reaktives Sprouting cholinergischer Fasern in die deafferenzierte Zone (C). B und D zeigen die Kontrollsituation bei Nachweis der Acetylcholinesterase (B, C) und Färben mit Fluoro-Jade, ein Farbstoff, der spezifisch neuronales Degenerationsgewebe markiert. Maßstab in C und D 100 μ m, in E 35 μ m. Mf, Moosfasern; a, Alveus;

dg, Gyrus dentatus; gcl, Körnerzellschicht; iml, innere Molekularschicht; hi, Hilus; r, Stratum radiatum; o, Stratum oriens; p, Pyramidenzellschicht; Sch, Schaffer Kollateralen.

Während das Ausmaß der schichten-spezifischen Denervierung dieser drei Techniken vergleichbar ist, steht eine detaillierte, vergleichende Studie zu möglichen Unterschieden läsionsinduzierter molekularer Veränderungen noch aus. In der vorliegenden Arbeit wurde das Modell der Transektion des Tractus perforans via mechanischer Läsion des entorhinalen Cortex (ECL) verwendet. Diese Läsion führt zur einer massiven Degeneration entorhinaler Fasern und einem Verlust von ca. 90% der Synapsen in der äusseren Molekularschicht des ipsilateral zur Läsion liegenden Gyrus dentatus (Matthews et al., 1976 a). Nach ca. 10 Tagen beginnt das Einwachsen aussprossender Fasern schichten-spezifisch in die denervierten Zonen des Hippocampus. Dieser Prozess wird als reaktives Sprouting, Aussprossung, bezeichnet (Raisman, 1969). Innerhalb von 30 Tagen nach der Läsion werden die degenerierten Synapsen zu 70% des Ausgangswertes durch Neubildung von Synapsen ersetzt (Matthews et al., 1976 b; Steward et al., 1988). Dieser Prozess wird als reaktive Synaptogenese bezeichnet. Die am Aussprossen beteiligten Systeme sind kommissurale- und Assoziationsfasern (Zimmer et al., 1975), Fasern des contralateralen entorhinalen Cortex (Steward et al., 1976) und septale, vorwiegend cholinerge Afferenzen (Lynch et al., 1973; Nadler et al., 1977). Nach der klassischen Auffassung erweitern diese drei Fasersysteme ihre spezifisch in der inneren Molekularschicht liegende Termination auf die denervierte äussere Molekularschicht im Sinne eines translaminären Sprouting. Durch verfeinerte anatomische Tracingtechniken konnte die Arbeitsgruppe von M. Frotscher jüngst zeigen, dass das schichten-spezifische Sprouting von kommissuralen Fasern entgegen der klassischen Auffassung einer translaminären Genese von intralaminar liegenden Fasern, also Fasern innerhalb der denervierten Schicht, ausgeht (Deller et al., 1995, 1996a, b; Frotscher et al., 1997; Deller & Frotscher, 1997). Es liegt nahe, dass für dieses Phänomen bisher unbekannte, schichten-spezifisch exprimierte Faktoren im Bereich der äusseren Molekularschicht des Gyrus dentatus verantwortlich sind.

Der Prozess des Aussprossens im adulten ZNS wurde als Beispiel für die Plastizität und Reorganisationsfähigkeit nach Schädigung angesehen (Lynch et al., 1973, Kelley & Steward, 1997). Mit Hilfe von etablierten Verhaltenstests [Kurzzeitgedächtnis (operant delayed match to position task), Aufmerksamkeit (serial five-choice reaction time task) und räumliches Lernen (Morris water maze)] konnte an Ratten mit unilateraler ECL gezeigt werden, dass ein

initial zu beobachtendes verschlechtertes Lernverhalten sich zwei Wochen nach Läsion, also zu einem Zeitpunkt, an dem die ursprüngliche Synapsendichte durch Synapsenneubildung aussprossender Fasern weitgehend erreicht ist, wieder normalisiert (Myhrer, 1975; Hardman et al., 1997; Kirkby & Higgins, 1998). In morphologischen Studien sind jedoch nach ECL langanhaltende, transneuronalen Veränderungen von Körnerzellen und einer Subpopulation GABAerger Neuronen im Gyrus dentatus beschrieben (Nitsch & Frotscher, 1993; Diekmann et al., 1996). Inwieweit diese morphologischen Veränderungen verhaltensbiologische Konsequenzen nach sich ziehen, ist unklar.

In verschiedenen experimentellen Läsionsmodellen konnte reaktives Sprouting induziert und in seinem zeitlichen Verlauf deskriptiv erfasst und dokumentiert werden. Die molekularen Mechanismen sind jedoch noch weitgehend unverstanden (Kelley & Steward, 1997). Gerade die Initiierung des Sproutingprozesses und die Mechanismen der Zielfindung, d. h. des schichtenspezifischen Aussprossens sind noch unklar. Das Verständnis des reaktiven Sproutings und der Synaptogenese nährt die Hoffnung, neue therapeutische Ansätze in der Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen, der epilepsiebedingten Schädigungen und der durch Traumata entstandene Läsionen im ZNS zu entwickeln, die das zielgerichtete Auswachsen regenerierender Nervenfasern fördern und damit die Wiederherstellung verlorengegangener Kontakte zu ermöglichen.

1.3 Ein sequestrierter Prozess im Hippocampus nach entorhinaler Cortex Läsion

Die physiologischen und morphologischen Veränderungen wurden im Hippocampus nach ECL intensiv untersucht (Kelley & Steward, 1997), so dass sich eine Klassifikation der zeitlich geordneten Ereignisse wie folgt ergibt:

1. Eine sofortige Reaktion vom Eingriff an bis 12 Stunden nach ECL (Dasheiff & McNamara, 1982; Nitsch & Frotscher, 1992; Phillips & Belardo, 1994).
2. Ein früher Zeitverlauf mit Beginn der Wallerian'schen Degeneration und initialer glialer Reaktion (Kelley & Steward, 1996; Savaskan et al., 2000; Steward et al., 1993).
3. Die Zeitperiode, in der degenerative Prozesse auf dem Höhepunkt und die gliale Phagozytoseaktivität maximal ist (2-8 dal) (Bechmann & Nitsch, 1997; Gall et al., 1979; Jensen et al., 1994).
4. Das Zeitfenster, in dem axonales Aussprossen und die Synapsenformation beginnt und ihr Maximum erreicht (6-12 dal) (Scheff & Cotman, 1977; Matthews et al., 1976b).
5. Die Periode, in der das Sprouting und die Synaptogenese beginnt und abgeschlossen wird (12-30 dal) (Lee et al., 1977; Matthews et al., 1976b; Steward & Loesche, 1977).

6. Der Zeitverlauf während gliale Aktivität auf das Normalniveau sinkt und die dendritische Alteration auftritt und persistiert (12-30 dal) (Steward, 1995; Steward et al., 1993).

Jeder dieser Phasen weist ein charakteristisches Muster von Expression oder Repression von Genen wie den immediate-early genes, Neutrophinen, Cytokinen, extrazellulären Matrixproteinen, neuronalen wachstums-assoziierten Molekülen, Neurotransmitterrezeptoren, tubulären und filamentären Proteinen und Zelladhäsionsmolekülen (in Tabelle 1 sind die bisher beschriebenen Veränderungen der Gen- und Proteinexpression nach ECL zusammengefasst). Die letztgenannte Klasse von Molekülen ist in der Tat wahrscheinlich an der Determinierung der Schichtenspezifität, zumindest während der Entwicklung des entorhino-hippocampalen Systems, beteiligt. In *in vitro* Kokulturrexperimenten konnte nachgewiesen werden, dass entorhinale Axone ihr Zielgebiet, die äussere Molekularschicht des Gyrus dentatus, via kontaktvermittelter Wegfindung erreichen (Frotscher & Heimrich, 1993; Woodhams et al., 1993; Li et al., 1993, 1994). In einem anderen experimentellen Ansatz führte trotz zeitlichen Vertauschens der Innervationsabfolge das Auswachsen von Fasern in der Kokultur weiterhin zu einer schichten-spezifischen Organisation, wie sie *in vivo* zu finden ist (Frotscher & Heimrich, 1993). Die *in vivo* ablaufende Innervierung des Gyrus dentatus beginnt mit dem Auswachsen von entorhinalen Fasern in die äussere Molekularschicht und wird gefolgt von später eintreffenden commissuralen Afferenzen in die innere Molekularschicht. Die Resultate dieser Experimente und die Beobachtungen des schichtenspezifischen Aussprossens nach Läsion führten zu der Annahme, dass der Prozess der schichten-spezifischen Innervation und Re-Innervation im Hippocampus über kontaktabhängige Mechanismen vermittelt ist.

1.4 Mechanismen axonaler Wegfindung während der Entwicklung

Welche Mechanismen vermitteln auswachsenden Axonen die direktionale Information zur Zielfindung? Grundsätzlich gilt es als unwahrscheinlich, dass die Moleküle, die das läsionsinduzierte schichten-spezifische Sprouting steuern, völlig neue Faktoren sind, die nicht unter physiologischen Bedingungen oder während der Entwicklung dieses Systems eine wichtige Rolle spielen (Nedivi, 1999; Nieto-Sampedro, 1999). Es wurde gezeigt, dass Moleküle, die während der Entwicklung stark exprimiert sind und in der Adoleszenz nur noch eine basale oder keine Expression zeigen, nach Schädigung in diesem System reexprimiert werden (Bovolenta et al., 1997). Für entwicklungsabhängige Prozesse wurde eine

Veränderte neuronale und gliale Gen/Protein Expression nach ECL

Gen/Protein	Zeitverlauf	Zelltyp	Referenz
Beta-Amyloid Precursor Protein	3 – 7 dal erhöht	MG	Banati et al 1994
bFGF-2	2 – 15 dal erhöht	AG	Gomez-Pinilla et al. 1992; Fagan et al., 1997
Cathepsin S mRNA	1 – 5 dal erhöht	MG	Petanceska et al. 1996
IL-1	1 - 4 dal erhöht	MG	Fagan & Gage, 1990
TGF- β 1 mRNA	1 - 10 dal erhöht	MG	Morgan et al. (1993)
CNTF	3 – 7dal erhöht	AG	Guthrie et al. 1997
GFAP & mRNA	2 - 30 dal erhöht	AG	Steward et al. 1993 Jucker et al. 1995
GSI-B ₄	3 - 8 dal erhöht	MG	Gehrmann et al. 1991
Vimentin	2 – 10 dal erhöht	AG	Krohn et al., 1995
ILGF ½ mRNA	2 - 4 dal erhöht	MG	Woods et al. 1998
GAP-43	2 - 20 dal erniedrigt	N	Benowitz et al., 1990
RB3 mRNA	1 – 5 dal erhöht	N	Beilharz et al., 1998
SCG 10 mRNA	2 – 10 dal erhöht	N	Zarow & Finch, 1995
stathmin mRNA	2 - 15 dal erhöht	N	Bräuer et al., 2001
5'-nucleotidase Enzym	10 - 40 dal erhöht	MG, AG	Schoen, S.W.
Nucleosid Diphosphatase	2 - 21 dal erhöht	MG	Jensen et al. 1994
Glutamate-Dehydrogenase	2 - 100 dal erhöht.	AG	Kugler et al. 1995;
c-fos mRNA	15 min-4 h erhöht	N	Nitsch & Frotscher, 1992
c-jun	2 hr - 4 hr erhöht	N	Haas et al., 1997
Arc & mRNA	4hr – 3 dal erhöht	N	Steward et al., 1998
tau-alpha-1 mRNA	1 – 15 dal	N	Miller & Geddes, 1990
NF 68	1 – 12 dal	N	Steward, 1995
MAP2	8 dal erhöht	N	Caceres et al., 1988
SNAP 25	1 – 20 dal erniedrigt	N	Geddes et al., 1990b
PDP 95	1 – 30 dal erniedrigt	N	Sampedro et al., 1982
GABA _A R β -subunit	3 – 30 dal erniedrigt	N	Mizukami et al., 1997
NMDA R1	5 – 9 dal erhöht	N	Gazzaley et al., 1997
Adenosine A ₁ Receptor	14 dal erhöht	N	Kahle et al., 1993

Tab. 1:

Alterierte Genexpression nach schichtenspezifischer Deafferenzierung im Hippocampus. Aufgelistet sind die in der Literatur beschriebenen Faktoren mit Ausnahme der membran- und ECM assoziierter Moleküle, die nach Schädigung eine veränderte Expression im Hippocampus zeigen. AG, Astrozyten; MG, Mikroglia N, Neurone; dal, days after lesion.

Klassifikation zur Beschreibung der axonalen Wegfindung etabliert, die erstmals von Sperry als Chemoaffinitätshypothese formuliert wurde. Die mehrfach modifizierte und sicher reduktionistische Hypothese hat sich dennoch zur Beschreibung experimenteller Phänomene als brauchbar erwiesen (Abb. 2):

kontaktvermittelte Attraktion

kontaktvermittelte Repulsion

Chemoattraktion

und Chemorepulsion.

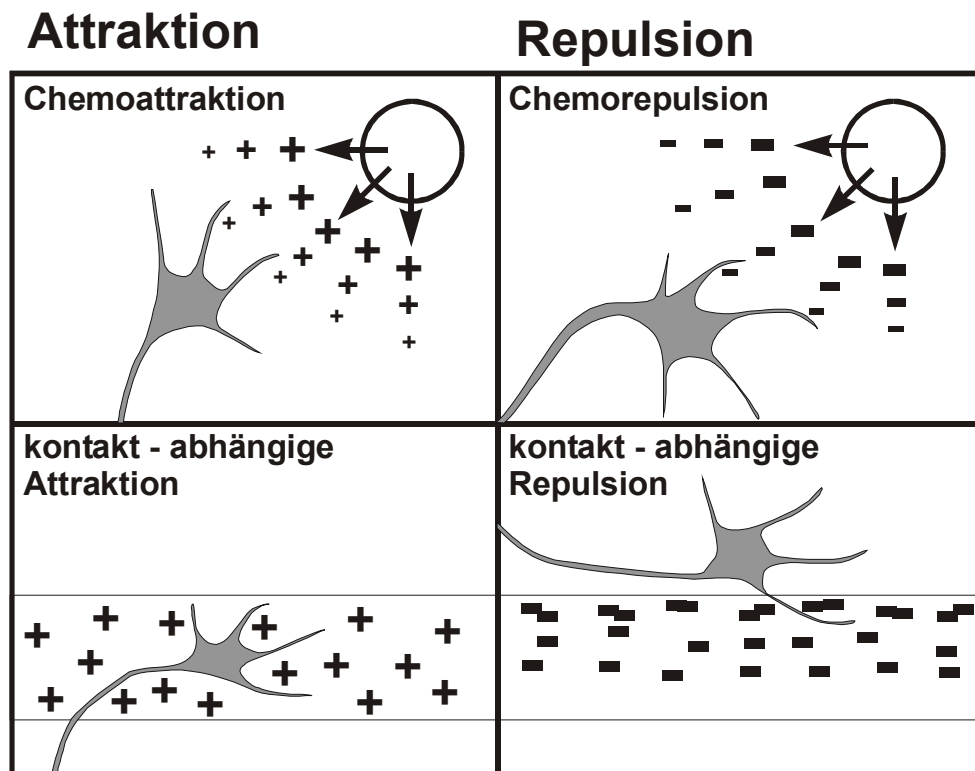


Abb.2:

Modell der axonalen Wegfindung. In diesem Schema sind die vier Mechanismen der axonalen Weg- und Zielfindung illustriert: Kontaktvermittelte sowie distanzvermittelte Attraktion und Repulsion. Der Wachstumskegel ist in grau dargestellt. Um eine Dimension komplexer wird das Modell, wenn hinzugenommen wird, dass Axone differentielle Rezeptoren und Ektoenzyme, so z. B. Metalloproteasen, auf ihrem Wachstumskolben tragen und damit ihre eigene Mikroumwelt bilden können. Dieser Umstand kann die unterschiedliche Sensitivität verschiedener Axone für ein und demselben Liganden bei gleicher Rezeptorausstattung erklären.

Im Prinzip kann also gerichtetes axonales Wachstum über attraktive, kontaktvermittelte Faktoren, die im Zielgebiet liegen (Cadherine, NCAM, LAMP, L1), oder über attraktive, über eine weite Distanz hin sekretierte (diffusible) Faktoren (Netrine, Slit-1 & 2, Lamininisoformen, HGF/SF), die in einem Gradienten mit der höchsten Konzentration im Zielgebiet vorliegen, vermittelt werden. Es hat sich jedoch im Laufe der Identifizierung von axonalen Lenkungsmolekülen gezeigt, dass ebenso repulsive Faktoren gerichtetes axonales Wachstum über kontakt-vermittelte (transmembranäre Semaphorine, Ephrine) und distanzvermittelte (sekretierte Formen von Semaphorinen, Netrine) Moleküle steuern können (Tessier-Lavigne & Goodman, 1996; Goodman, 1996). Tracerstudien an Hippocampi verschiedener Entwicklungsstadien ergaben, dass entorhinale Fasern ihre korrekte Zielregion und Schichten in einer selektiven Weise noch vor der Geburt erreichen, was zur Annahme führte, dass spezifische, diffusible und substrat-gebundene axonale Lenkungsmoleküle diesen

Prozess vermitteln (Super & Soriano, 1994; Linke et al., 1995). Neuere Studien zeigten, dass an diesem Prozess die von S. Ramon y Cajal und G. Retzius erstmals beschriebenen Cajal-Retzius Zellen wesentlich beteiligt sind (Ceranik et al., 1999; Retzius, 1893; Ramon y Cajal, 1929). Jedoch ist noch nicht geklärt, welche molekularen Mechanismen diese Zellen für die Signaltransduktion anwenden. Zusätzlich wurden Mitglieder der Familie der Semaphorine (Sema 3A-F), Netrine, Slit und Ephrine (Ephrin A1, A3, A5) identifiziert, die eine Leitfunktion für entorhinale Axone bilden (Gao et al., 1996; Chedotal et al., 1998; Stein et al., 1999; Nguyen Ba Charvet et al., 1999; Steup et al., 2000; Pozas et al., 2001; zusammengefasst in Skutella & Nitsch, 2001). Bestärkt wurden diese Befunde durch die Identifikation von spezifischen Rezeptoren dieser axonalen Lenkungsmoleküle, so dass diese Rezeptor-Liganden Interaktionen in einem ganz bestimmten räumlich-zeitlichen Muster auftreten können. Dies garantiert einen einzigartigen Informationscode mit einer für das jeweilige System spezifischen räumlich-zeitlichen Ausprägung.

1.5 Membran-assoziierte Moleküle nach entorhinaler Cortex Läsion

Welche Faktoren vermitteln das schichten-spezifische Sprouting im Hippocampus? Moleküle der Immunglobulin Superfamilie (IgSF) haben auswachsfördernde und richtungsgebende Aktivität auf Axone (Rathjen & Schachner, 1984, Treubert & Brümmendorf, 1998, Walsh & Doherty, 1997). So wurde z. B. für die embryonale Form von NCAM gezeigt (eNCAM oder PSA-NCAM, PSA steht für hoch polysialysiert), dass dieses Zelladhäsionsmolekül axonales Auswachsen verstärkt und gerichtete Zellmigration vermittelt (Cremer et al., 1994). LAMP, eNCAM, Neurotractin/Kilon und L1, die ebenfalls Mitglieder der IgSF sind, sind entwicklungsabhängig exprimiert und fördern axonales Längenwachstum (Cremer et al., 1994; Ono et al., 1994; Tang et al., 1994; Tomasiewicz et al., 1993). *In vivo* wird eNCAM während der Perioden des axonalen Längenwachstums exprimiert. Der permissive Effekt dieses Moleküls hängt von seinem posttranslational regulierten Polysialysat-Grad ab (Ono et al., 1994). Nach entorhinaler Läsion werden eNCAM und L1 im Gyrus dentatus hochreguliert (Miller et al., 1994; Styren et al., 1995). eNCAM ist spezifisch auf den deafferenzierten Körnerzellendendritabschnitten exprimiert, während die Körnerzellendendriten der inneren Molekularschicht sowie Körnerzellendendriten nichtlädierter Tiere nur eine schwache eNCAM Expression zeigen (Miller et al., 1994). Die aussprossenden Axone, die die denervierten Dendritenabschnitte innervieren, exprimieren das Zelladhäsionsmolekül L1 (Styren et al., 1995). Die topographische Expression von eNCAM nach ECL macht dieses Molekül zum potentiellen Kandidaten für die schichten-spezifische kontaktvermittelte Attraktion von

sproutenden Axonen. LAMP, ein weiteres Mitglied der IgSF mit längenwachstumsfördernden Eigenschaften, ist an der Zielfindung von septalen Fasern in die innere Molekularschicht des Gyrus dentatus beteiligt (Pimenta et al., 1995). Interessanterweise wurde nach ECL keine Veränderung in der LAMP mRNA Expression beobachtet (Bräuer et al., 2000). Dies schliesst jedoch nicht aus, dass LAMP, wenn auch nicht für die entorhino-hippocampale Projektion, so doch für die septo-hippocampale sowie intrahippocampale Fasersysteme ein kontaktvermitteltes Erkennungsmolekül darstellt. In Tabelle 2 sind alle neuronalen und nichtneuronalen membran-assoziierten und ECM Moleküle dargestellt, für die eine alterierte Expression nach ECL beschrieben wurde. Insgesamt ist jedoch völlig offen, welche Moleküle nach Läsion des entorhinalen Cortex das laminaspezifische Aussprossen in die äussere Molekularschicht des Gyrus dentatus hervorrufen und regulieren. Auch ist noch nicht geklärt, inwieweit im denervierten Hippocampus Moleküle exprimiert werden, die eine schichten-spezifische Reorganisation der axonalen Konnektivität verhindern bzw. ermöglichen.

Neuronale und gliale Änderung der membran-assoziierten Gen/Proteinexpression nach ECL

Gen/ Protein	Zeitverlauf	Zelltyp	Referenz
Neurocan & mRNA	2 – 6 Monate erhöht	AG	Haas et al., 1999
Brevican & mRNA	1 – 6 Monate erhöht	AG	Thon et al., 2000
Tenascin-C & mRNA	2 - 21 dal erhöht	AG	Deller et al., 1997
NCAM 120/140 mRNA	2 - 4 dal erhöht	AG	Jucker et al., 1995
ESA	2 - 15 dal erhöht	AG	Savaskan et al., 2000
FGF-2	8 hr - 7 dal erhöht	AG	Fagan et al., 1997
ILGF-1 mRNA	8hr - 7 dal erhöht	AG	Guthrie et al., 1995
CR3/CD11b	1 - 7 dal	MG	Jensen et al. 1997
MHCclass I & II	1 - 7 dal	MG	Jensen et al., 1994, 1997
Apolipoprotein E mRNA	2 – 6 dal erniedrigt 10 - 14 dal erhöht	AG	Poirier et al., 1992; Zarow & Victoroff, 1998
Sulfated glycoprotein-2 (clusterin)	2 - 14 dal erhöht	AG	May et al., 1990 Lampert-Etchells et al., 1991
LFA-1 α & VLA-4	1 - 7 dal erhöht	MG	Hailer et al., 1997
CD86	5 dal- mehrere Wochen erhöht	MG	Bechmann et al., 2001
ICAM-1	3 - 7 dal erhöht	MG	Hailer et al., 1997
CD45	2 - 14 dal erhöht	MG	Jensen et al. 1997
SCG10 mRNA	10 dal erhöht	N	Zarow & Finch, 1995
eNCAM (PSA-NCAM)	15hr - 60 dal erhöht	N	Miller et al., 1994
L1	30 dal erhöht	N	Styren et al., 1994

Tab.2:

Membran- und ECM assoziierte Faktoren nach Deafferenzierung des Hippocampus. AG, Astrozyten; MG, Mikroglia; N, Neurone; dal, days after lesion.

2. AUFGABENSTELLUNG & EXPERIMENTELLE VERSUCHSANORDNUNG

2.1 Fragestellung dieser Arbeit

Läsionen des entorhinalen Cortex führen zu einer selektiven partiellen Deafferenzierung der Dendriten der äusseren Molekularschicht des Gyrus dentatus, gefolgt von axonalem Sprouting und reaktiver Synaptogenese. So kommt es zum Sprouting nur solcher kommissuralen Fasern, die ohnehin in der Terminationszone des Tractus perforans liegen. Es liegt nahe, dass für dieses Phänomen bisher noch nicht identifizierte, lamina-spezifisch exprimierte Faktoren in der äusseren Molekularschicht verantwortlich sind, obgleich auch die Möglichkeit bestehen könnte, dass der Verlust repulsiver Faktoren in der betroffenen Schicht das Auswachsen in die Zone der nun freien Dendritenabschnitte ermöglicht.

Diese Arbeit steht im Kontext der Frage, welche Moleküle beim schichten-spezifischen Sprouten im adulten Hippocampus beteiligt sind. Grundsätzlich bestehen folgende Möglichkeiten zur Erklärung der Ursachen des schichtenspezifischen Aussprossens:

1. Die *de novo* Expression von bisher nicht vorkommenden Faktoren in den betroffenen Zonen.
2. Die Reexpression von während der Entwicklung der hippocampalen Terminationszonen Afferenzen vorkommenden membran-assoziierten Faktoren.
3. Die reduzierte Expression oder Repression von membran-assoziierten Faktoren, die während der Adoleszenz als Stabilisatoren des hippocampalen Systems dienen.

Wie unter 1.4 besprochen, sind nicht allein kontaktabhängige Mechanismen der axonalen Wegfindung bekannt, sondern es wurde auch experimentell distanzvermittelte Attraktion und Repulsion (Chemoattraktion und Chemorepulsion) nachgewiesen. Die drei Interpretationsmöglichkeiten zur Beschreibung des Sproutingphänomens sind also auch gut auf sekretierte Faktoren anwendbar. Vorarbeiten von verschiedenen Arbeitsgruppen gaben erste Hinweise, dass bei der Etablierung der entorhino-hippocampalen sowie kommissuro-hippocampalen Wegfindung membran-assoziierte Faktoren eine entscheidende Rolle spielen (Li et al., 1993; Frotscher & Heimrich, 1993; Woodhams et al., 1993).

Zum Studium der membran-assoziierten Faktoren mussten geeignete Assays etabliert werden, die eine systematische Analyse dieser Faktoren erlauben. Dabei mussten folgende methodische Fragen geklärt werden:

1. Gibt es geeignete Methoden zur Präparation und Anreicherung membran-assoziiierter Proteine, die für *in vitro* Studien noch ausreichend biologisch aktiv sind?
2. Wie lassen sich verschiedene Membranfraktionen in geeigneter Weise und simultan auswachsenden Neuriten anbieten?
3. Wie können auswachsende Neuriten dargestellt und von Dendriten unterschieden werden?
4. Welche Methoden sind geeignet, mögliche auswachsverstärkende Aktivität zu quantifizieren und das oder die beteiligten Proteine zu identifizieren?

Nach Klärung der methodischen Probleme stehen folgende inhaltliche Fragen offen:

1. Lässt sich der Einfluss membran-assoziiierter Faktoren während der Entwicklung des entorhino-hippocampalen Systems in einem *in vitro* Assay erfassen?
2. Gibt es maturationsabhängige Veränderungen im sich entwickelnden Hippocampus?
3. Ist das zielgerichtete und laminaspezifische Einwachsen entorhinaler Fasern in den Hippocampus von attraktiven oder repulsiven Lenkungsmolekülen kontrolliert?
4. In welchem Zeitfenster sind diese attraktiven und/oder repulsiven Faktoren im sich entwickelnden Hippocampus präsent?
5. Sind membran-assoziierte Lenkungsmoleküle im deafferenzierten Hippocampus vorhanden, die die schichten-spezifische Leitung sproutender Fasern steuern?
6. In welchem zeitlichen Rahmen findet die mögliche schichten-spezifische axonale Lenkung statt?
7. Lässt sich der Einfluss von membran-assoziierten Faktoren während der Entwicklung zu denen während der Reorganisation im adulten Hippocampus auf entorhinale Axone vergleichen?

2.2 *In vitro* Assays in der zellbiologischen Forschung

In vitro Assays sind Testsysteme, die es erlauben, komplexe zelluläre Prozesse und den zugrundeliegenden Mechanismen unter standardisierten Bedingungen zu analysieren und so qualitative bzw. quantitative Aussagen ermöglichen. Die Forschung der letzten Jahre hat gezeigt, dass durch die Entwicklung geeigneter Assays gerade in den Biowissenschaften enorme Wissenszuwächse folgten [so z.B. Southern blotting (E. Southern, 1979), PCR-Analyse (K. Mullis et al., 1986), Patch-clamp recording (E. Neher & B. Sakmann, 1984), Mutationsanalysen in high out put screening Verfahren (C. Nüsslein-Vollhard & E.

Wieschaus, 1980) und aktuell die Stammzell-Kultivierung (Mc Kay, 1989). Es ist unumstritten, dass die Erkenntnisse aus *in vitro* Assays äusserst wertvoll und als Basis für weitere Untersuchungen unabdingbar sind, auch wenn es das Ziel biomedizinischer Forschung immer ist, *in vitro* Ergebnisse in nachfolgenden Untersuchungen in *in vivo* oder zumindest unter *in vivo*-ähnlichen Bedingungen zu überprüfen. Das Testen von Hypothesen in *in vitro* Assays sind also notwendige Vorbedingungen zur Absicherung vor klinischen Anwendungen.

2.3 *In vitro* Assays zum Studium membran-assoziiierter Faktoren

Die ersten Arbeiten, die Hinweise für einen kontaktabhängigen Mechanismus bei der Zielfindung entorhinaler Fasern in den Hippocampus erbrachten, benutzten den Hirnschnitt-Kokultur Assay (Li et al., 1993; Frotscher & Heimrich, 1993). Dabei werden mit Hilfe eines Tissue Chopper oder Vibratome Gewebeschnitte von 200-500 µm Dicke angefertigt und daraus dann Hippocampus (Zielgebiet) und entorhinaler Cortex (Ursprungsgebiet) präpariert und gemeinsam in Kultur gebracht. Eine Abwandlung daraus ist der Adherence Assay, bei dem an einem Kryotom 10-20µm dicke Hirnschnitte mit erhaltender Histoarchitektur angefertigt ('organotypische Membranarchitektur') und mit primären Einzelzellen aus dem Ursprungsgebiet superkultiviert werden (Emerling & Lander, 1996; Förster et al., 1998). Ergebnisse aus Untersuchungen mit diesem Assay bestätigten die Annahme, dass attraktive membran-assoziierte Faktoren im Gyrus dentatus vorliegen, die durch entorhinale Neurone erkannt werden und gegenüber Faktoren in anderen Regionen bevorzugt werden (Förster et al., 1998). In einem weiteren Assay, dem 3T3 Spreading Assay, arbeitet man mit präparierten Membranen, mit denen man Zellkulturschalen beschichtet und dann Neurone oder 3T3 Fibroblasten kultiviert (Savio & Schwab, 1989). Der Vorteil dieses Assays ist die Möglichkeit, die Membranen vor der Kultivierung zu behandeln und zu modifizieren, so z.B. mit Antikörpern zum Neutralisieren von bestimmten Zelladhäsionsmolekülen. Zur Untersuchung von axonalen Lenkungsmolekülen im retinotectalen System wurde mit Erfolg der Streifenassay eingesetzt, bei dem auswachsende Axone zwei simultan angebotenen, alternierenden Membranfraktionen konfrontiert werden (Bonhoeffer & Huf, 1985). Dieses experimentelle Testsystem schien besonders geeignet, die unter 2.1 genannten Fragen experimentell nachzugehen, da:

1. zwei Substrate innerhalb eines Experiments enthalten sind (also die systematischen und zufälligen Fehler für beide Substrate gleich sind)

2. die Membranfraktionen vor dem eigentlichen Auswachsen manipuliert werden können
3. die Auswertung und Quantifizierung zuverlässig und standardisiert möglich ist.

2.4 Der Streifenassay und der Längenauswachsassay

Der Streifenassay ermöglicht die Beobachtung des morphologischen Verhaltens von auswachsenden Neuriten eines Explantats als Reaktion auf membrangebundene attraktive oder repulsive Faktoren. Der von Dr. F. Bonhoeffer entwickelte Assay wurde mit Erfolg zum Testen von axonalem Auswachsen auf gereinigten Membranfraktionen angewandt (Drescher et al., 1995). Der Längenauswachsassay basiert auf dem Streifenassay und dient allein dem Vergleich axonalem Auswachsens auf verschiedenen Substraten. Der Vorteil dieses Assays liegt in der vorgegebenen Richtung, in der Neuriten nur auswachsen können. Damit lässt sich die Auswachslänge gut quantifizieren und Auswachslängen auf verschiedenen Substraten vergleichen. Eine schematische Darstellung beider Assays ist in Abb. 3 wiedergegeben. Mit Hilfe immunologischer Marker ist die Diskriminierung der auswachsenden Fasern weiterhin bestimmbar. So kann mittels geeigneter Antikörper die dendritische (MAP2) und axonale (MAP1) Identität der auswachsenden Fasern festgestellt werden.

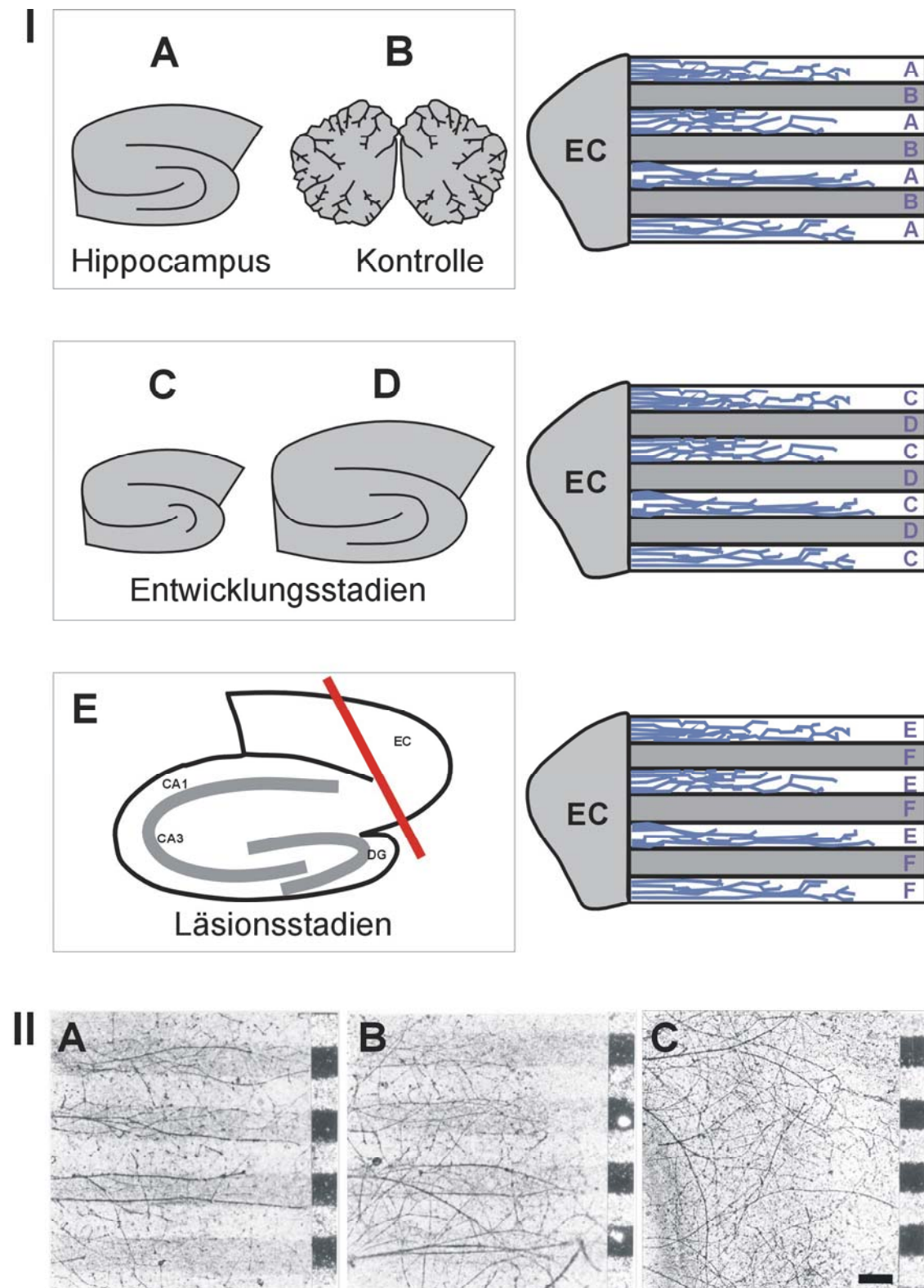


Abb. 3:

Schematische Illustration der experimentellen Versuchsanordnung sowie die Kriterien axonalen Auswachsverhaltens. I zeigt den experimentellen Ansatz des Streifenassays. In dieser Arbeit wurde das axonale Auswachsverhalten von entorhinalen Explantaten auf Membranen von normotypischen und atypischen Zielregionen, verschiedenen Entwicklungsstadien des Hippocampus und Hippocampi verschiedenerer Läsionsstadien verglichen. II Nach den Kriterien von Bähr & Wizenmann (1996) wurde das axonale Auswachsverhalten folgendermassen bestimmt: A klare Auswachspräferenz, B leichte Präferenz und C keine Präferenz/zufälliges Auswachsen. Maßstab 90 µm.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Tiere und stereotaktische Operation

Alle Tiere und die mit ihnen durchgeführten Experimente wurden in Übereinstimmung des Europäischen und Deutschen Gesetzes zum Gebrauch von Labortieren durchgeführt.

Die stereotaktischen Läsionen erfolgten an männlichen adulten Wistar Ratten mit einem Körpergewicht von 250-350 g. Unter tiefer Anästhesie mit einer Mischung aus 25 mg/ml Ketamin, 1,2 mg/ml Xylazin und 0,35 mg/ml Acepromazin in 0,9% NaCl (2,5 ml/kg Körpergewicht) wurden die Tiere in einen stereotaktischen Kopfhalter eingespannt (Stoelting, Germany). Ein Standardelektrokoagulator diente zur Inzision in frontaler und sagittaler Ebene zwischen entorhinalen Cortex und Hippocampus (mit vier Einzelpulsen à 2,5 μ A für je drei Sekunden). Die folgenden Koordinaten von λ ausgehend und in Anlehnung an Paxinos et al. (1985) wurden verwendet: frontale Inzision: AP, +1,2 mm; L, +3,1-6,1 mm; V, bis auf Tiefe des Craniums; sagittale Inzision: AP, +1,2 zu +4,2 mm; L, 6,1 mm; V, bis auf Tiefe des Craniums. Die Tiere überlebten für 4, 10, 20, 30 und 80 Tage (\pm 0,5 d, drei Tiere je Läsionsstadium, ein Tier aus jedem Läsions- und Kontrollstadium für eine experimentelle Versuchsanordnung), wurden tief anästhesiert (s. o.) und dekapitiert. Nach Entfernen der Kutis vom Schädeldach wurde die Ossa parietalis vom Foramen magnum aus mit einer Luer-Zange entfernt und das freiliegende Hirn in +4°C gekühlten sterilen PBS aufgenommen. Die Hippocampi wurden unter visueller Kontrolle eines Binokulars entnommen. Für postnatale hippocampale Membranen wurden 10 P0 Tiere je experimentellem Ansatz verwendet. Hippocampi von adulten nichtoperierten Ratten mit identischen Körpergewicht dienten als Kontrollen.

3.2 Methodologische Überlegungen

Um den Erfolg der stereotaktischen Läsion, also die Diskonnektion des Hippocampus vom entorhinalen Cortex zu überprüfen, wurden die Hirne mit einem Tissue Chopper (Bachofen, Reutlingen, Germany) geschnitten und der Operationseingriff makroskopisch verifiziert. Von jedem Hirn wurden je zwei Schnitte weiter histochemisch analysiert. Die frühen Läsionsstadien (1 - 10 Tage nach Läsion (dal)) wurden mit Fluoro-Jade (FJ) gefärbt (siehe 3.2.1). Dieser Farbstoff stellt spezifisch degenerierende Neurone und deren Fortsätze dar und ist im Vergleich zu Silberfärbemethoden für die Routine praktikabel. Die späteren Läsionsstadien (20 dal - 80 dal) wurden mit Hilfe der Acetylcholin-Esterase (AChE) Methode gefärbt (siehe 3.2.1) und dienen zur Darstellung von AChE-positiven Fasern, die nach ECL in

den deafferenzierten Schichten auftauchen und als reaktives Sprouting von septohippocampalen cholinergen Fasern interpretiert werden (Deller & Frotscher, 1997).

3.2.1 Fluoro-Jade (FJ) Färbung und AChE-Histochemie

Für die Fluoro-Jade Färbung (Histo-Chem, USA) und AChE-Histochemie wurden Hirnschnitte auf Gelantine beschichteten Objektträgern aufgezogen und luftgetrocknet. Zur FJ Färbung wurden die Hirnschnitte für 3 min in 100% Ethanol eingetaucht, und rehydriert über 75% Ethanol und doppelt destilliertem Wasser für je 1 min. Die Schnitte wurden dann in frisch angesetzter 0,06% Natriumpermanganat Lösung für 15 min inkubiert. Anschliessend folgte das Waschen in doppelt destilliertem Wasser für 1 min und die Inkubation in 0,001% FJ Lösung in 0,1% Eisessig für 30 min. Nach der Färbung wurden die Schnitte in doppelt destillierten Wasser gewaschen, luftgetrocknet und mit Entellan eingedeckelt (Merck, Germany).

Für den Nachweis der Acetylcholinesterase (AChE) wurde ein modifiziertes Karnovsky-Roots Protokoll angewandt (Mesulam et al., 1987). Aufgezogene und luftgetrocknete Schnitte wurden für 2 x 4 min in einem 0,1 M Maleatpuffer inkubiert und anschliessend für 2 hr in folgender Arbeitslösung entwickelt: 0,1 M Maleatpuffer mit Kupfersulfat, Kaliumhexazyanoferat, Natriumcitrat und Acetylthiocholine-Jodid. Die Schnitte wurden dann in einem 0,1 M Tris-Puffer gespült und für 3 min in einer 0,7% DAB Lösung unter Sicht entwickelt. Anschliessend wurden die Schnitte gewaschen in 0,1 M Phosphatpuffer und eingedeckelt.

3.3 Präparation der Explantate

In allen Streifen- und Auswachsassays wurden entorhinale Cortices aus E19-P0 Wistar Ratten entnommen. Ratten wurden durch Dekapitation getötet, die Gehirne entnommen und in eiskaltem PBS gewaschen. Die Meningen wurden entfernt und horizontale 300 - 400 µm dicke Schnitte wurden mit einem Vibratom (Series 1000. Tech. Products Inter., USA) angefertigt. Der entorhinale Cortex wurde aus den Hirnschnitten unter einer binoculären Optik bei 40-facher Vergrösserung microdisseziert und bis zur Kultivierung in Suspension bei +37°C und 5,5 % CO₂ bei 100 % luftfeuchtigkeit inkubiert. Das Kulturmedium (pH 7,4) bestand aus: Hank's balanced salt solution, normal horse serum 12,5 % (Gibco, Germany), 2 mM Glutamin, 2,5 mg/ml Glucose (Braun, Germany).

3.4 Membran- und Myelinpräparation

Hippocampi wurden von E16, P0, P5, P10, P15, P30 und adulten Wistar Rattenhirnen und Cerebelli von P0 Ratten entnommen. Aus zwei Falcon Kulturflaschen (je 75 cm²) mit konfluent ausgewachsenen NIH 3T3 Zellen (ATCC Nr.: CRL-1658), die stabil Ephrin-A3, Ephrin-A5 oder mock-transfiziert sind (Genbank acc. NM004952 (ephrin-A3, H-LERK3), NM001962 (ephrin-A5, H-LERK7) Coding frame kloniert in pcDNA 3.1, unter www.ncbi.nlm.nih.gov, www.tigr.org), wurden die Zellen mit einem Zellkratzer gelöst und im Homogenisierungspuffer zur weiteren Membranpräparation aufgenommen. Membranen wurden in Anlehnung an Walter et al. (1987) präpariert. Alle verwendeten Lösungen waren steril, auf +4°C gekühlt und hatten einen pH von 7,4. Der Homogenisierungspuffer war folgendermassen zusammengesetzt: 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 15 mM CaCl₂, 1 mM Spermidin (von Serva, Germany), Proteaseinhibitor Cocktail aus Aprotinin 500 µg/ml; Pepstatin 300 µg/ml; Leupeptin 750 µg/ml; (von Sigma, Germany). Das Gewebe wurde im Homogenisierungspuffer aufgenommen und erst mit einer dünnen Pipettenspitze und im Anschluss mit einer 27-Gauge Nadel luftblasenfrei homogenisiert. Das Homogenat wurde auf einem Stufengradienten aus 50 % und 5 % Sucrose pipettiert und für 20 min bei 50 000 g (+4°C) in einem SW 50 L Swingout Rotor (Beckmann, Germany) ultrazentrifugiert. Cytoplasmatische und mitochondriale Membranfraktionen bildeten eine dichte Interphase zwischen der 50 % und 5 % Sucrosephase, während die Nuclei pelletierten und das Cytoplasma in der 5%igen Sucrosephase gelöst war. Die Membranfraktion wurde mit einer Spritze aufgenommen und in PBS gewaschen (Eppendorf Zentrifuge). Die Konzentration jeder Membranfraktion wurde in Trispuffer (1,5 mM CaCl₂; Proteaseinhibitor Cocktail wie oben beschrieben) auf eine optische Densität von 0,4 bei $\lambda = 220$ nm eingestellt (Pharmacia Ultraspect 2000, Germany). Bei einer optischen Densität von 0,4 lag der Proteingehalt der Membranfraktion bei 100-200 µg/ml (bestimmt mit dem Bicinchoninic acid protein Assay mit bovinen Serumalbumin als Standard, in Anlehnung an Simpson & Sonne, 1982). Myelin wurde von anderen Membranen durch Ultrazentrifugation (75 000 g für 10 min) in einem Stufengradienten mit 25 %, 15 % und 5 % Sucrose getrennt (Colman et al., 1982). Myelin wurde aus der Interphase zwischen der 5 % und 15 % Sucrosephase gewonnen, während die myelin-freie Cytoplasmamembranfraktion aus der Interphase zwischen der 15 % und 25 % Sucrosephase gewonnen wurde.

Für die phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PI-PLC) Behandlung wurden die Membranfraktionen nach der optischen Densitätsbestimmung bei 37°C für eine Stunde mit

PI-PLC (1U/ml; ICN, Germany) inkubiert. Zur Kontrolle der enzymatischen Aktivität wurden Ephrin-A3 angereicherte Membranen behandelt und im anschliessenden Streifenassay getestet.

3.5 Streifenassay, Längenauswachsassay und Explantatkultivierung

Membranstreifen wurden in Anlehnung an Walter et al. (1987) mit einer Apparatur von Dr. F. Bonhoeffer angefertigt.

Die Membranstreifen-beschichteten Nuclepore Filter (0,4 µm Poren) wurden dann unter Fluoreszenzlicht beurteilt und nur diejenigen Filter, die ein reguläres Membranmuster aufwiesen, indiziert durch die Verteilung der fluoreszierenden Kugeln, wurden weiter verwendet.

Die membranbeschichteten Nuclepore Filter wurden dann in sterile Inserts (Millicell-CM, Millipore, Germany) mit 1,5 ml Kulturmedium überführt (DMEM/F12 mit 2 mM Glutamin, 0,6 % Glucose, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 12 % fötales Kälberserum). In den Neutralisierungsexperimenten wurden die beschichteten Nuclepore Filter mit den monoklonalen Antikörper IN-1 (Hybridoma Überstand, 15 - 30 µg/ml, Caroni & Schwab, 1988b) oder einem Kontrollantikörper (Antiratten IgG, 20 µg/ml, Sigma, Germany) für 30 min bei 37°C inkubiert und anschliessend in PBS gewaschen. Die Explantate sind noch am gleichen Tag mit einer Pipette unter Schonung des Nuclepore Filter auf die Membranen gebracht worden. Die Kulturen wurden in einem begasteten (5,5 % CO₂) und humidifizierten Inkubator (Nuare US Autoflow, Zapf Instrumets, Germany) für max. 4 Tage gehalten. Für den ersten Tag der Kultivierung wurde 8 µM Cytosinarabinosid dem Kulturmedium zugesetzt, um die Proliferation und das Auswachsen von nicht-neuronalen Zellen zu inhibieren.

3.6 Analyse des Streifen- und Auswachsassays

Neuriten wurden mit Hilfe des fluoreszierenden vitalen Farbstoff 5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl Ester (Molecular Probes, Netherland) visualisiert. Da dieser Farbstoff nicht zwischen neuronalen und glialen Strukturen diskriminiert, wurde in weiteren Experimenten die Nuclepore Filter immunocytochemisch mit einem monoklonalen Antikörper gegen das 160-kDa grosse Neurofilament (Boehringer, Germany) dargestellt. Nach zweistündiger Fixierung mit 4% PFA wurde zur selektiven Darstellung von Axonen der MAP-1 Antikörper verwendet (Sigma, M 4278) und in einer Konzentration von 5 µg/ml (für Anti-Neurofilament) bzw. 2 µg/ml (für Anti-MAP-1) für 12 Stunden bei +4°C inkubiert. Der sekundäre, biotinylierte Antikörper (Vector, USA) wurde für 4 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und im ABC/DAB Verfahren entwickelt, dann auf Objektträgern über eine 70 %, 80

%, 90 %, 98 % und 100 % Ethanolreihe dehydriert und mit Immu-Mount (Shandon, USA) eingedeckelt.

Im Streifenassay wurde die Analyse als Blindexperiment mit zwei unabhängigen Beobachtern durchgeführt, und das Auswahlverhalten wurde mit einem Drei-Klassen System nach Bähr & Wizenmann (1996) semiquantitativ ausgewertet. Für die statistische Auswertung wurde das Neuritenwachstum der Explantate, die auf P0 bzw. lädierten hippocampalen Membranen wuchsen, verglichen mit der Anzahl der Explantate, die keine Auswachspräferenz oder eine Präferenz für die jeweilige Kontrollmembran zeigten. Im Statview II Programm (Abacus, USA) wurden die Daten transferiert und mit dem chi-Quadrat Test auf statistische Unterschiede analysiert.

Im Längenauswachsassay wurde die Neuritenlänge als die Distanz zwischen der Explantatfront und dem Wachstumskolben des Axons bestimmt. Statistische Unterschiede zwischen den einzelnen Membranstreifen wurden mit Hilfe des Mann-Whitney U-Test ermittelt.

3.7 Immunohistochemische Nachweisverfahren zur Darstellung von Myelin

Um maturations-abhängige Unterschiede in der Expression von basischem Myelinprotein (MBP) und Myelin-assoziiertem Glycoprotein (MAG, beide von Boehringer Mannheim, Germany) zu erfassen, wurden Wistar Ratten unterschiedlicher postnataler Zeitstadien verwendet (P0, P10, P15, P30, P60). Die Tiere wurden tief anästhesiert (siehe unter 3.1) und transkardial mit 10-50 ml PBS langsam perfundiert, gefolgt von 80-200 ml PFA (4 %, mit 15 % Pikrinsäure). Perfundierte Hirne wurden aus der Kalotte freipräpariert und über Nacht bei +4°C im gleichen Fixativ nachfixiert. Horizontale Schnitte von 80 µm Dicke wurden mit einem Vibratom (Series 1000, Technical Products Int., Inc.) geschnitten und in 0,1 M PBS aufgesammelt. Die Schnitte wurden mit 0,6 % H₂O₂ für 30 min inkubiert zur Inhibition der endogenen Peroxidase. Konsecutive Schnitte wurden alternativ mit Anti-MBP (1:500 verdünnt in 0,1 M PBS mit 1 % NHS, 0,1 % NaN₃ und 0,1 % Triton) und Anti-MAG (1:10 verdünnt im selben Puffer) für 48 hr bei +4°C inkubiert. Nach fünfmaligen Waschen mit 0,1 M PBS à 15 min folgte die Inkubation mit dem biotinylierten Anti-Maus IgG (Vector Laboratories, 1:250 verdünnt in 0,1 M PBS) für 2 hr bei Raumtemperatur. Nach fünfmaligen Waschen mit 0,1 M PBS à 15 min folgte die Inkubation mit dem Avidin-Biotin Peroxidasekomplex im Dunkeln für 2 hr bei Raumtemperatur (Vectastain ABC Elite-Kit, 1:500 verdünnt in 0,1 M PBS). Die Immunreaktivität wurde mit dem Chromogen Diaminobenzidin (DAB) visualisiert (0,07 % DAB mit 0,001 % H₂O₂ in 0,1 M PBS für 10

min). Anschließend wurden die Schnitte auf gelantinebeschichteten Objektträgern gezogen, dehydriert in Ethanol und mit Entellan (Merk) eingedeckelt.

3.8 Verwendete Mikroskope und Bildgebungsverfahren

Die Untersuchungen von *in vivo*, d.h. noch laufenden Experimenten wurde mit Hilfe des inversen Mikroskops Olympus IX 70, alle anderen Untersuchungen mit dem Zeiss Axioplan durchgeführt. Die Dokumentation erfolgte mittels der Sensicam (PCO, 12 bit cooled imaging) bzw. mit der Fotokamera MC100. Folgende Filtersätze wurden verwendet: U-MNIBA narrow-band für FITC Fluoreszenz, U-MWIG für TRITC Fluoreszenz. Digitale Bilder oder eingescannte Fotoabzüge wurden in CorelDraw zusammengefasst und beschriftet. Eine digitale Bildbearbeitung im Sinne von Verstärkung von Kontrast und/oder Intensität fand nicht statt.

4. ERGEBNISSE

4.1 Streifenassay und repulsive Faktoren

In initialen Experimenten zur Evaluation des Streifenassays wurden Membranpräparationen von stabil transfizierten NIH 3T3 Zellen, die Ephrin-A3 oder Ephrin-A5 exprimieren, verwendet. Ephrin-A3 und A5 sind bekannte axonale Leitmoleküle, die auf Axonen verschiedener Regionen repulsive Eigenschaften haben (Drescher et al., 1995; Gao et al., 1996). Entorhinale Explantate wurden alternierende Membranstreifen von Laminin und Ephrin-A3 angeboten, und auswachsende Fasern mieden die Ephrin-A3 Membranstreifen und bevorzugten die Lamininstreifen (Abb. 4a). Im Unterschied dazu zeigten entorhinale Neuriten bei der Membrankombination zwischen Laminin und Ephrin-A5 sowie von Membranen von mock-transfizierten (mit leeren Vektor transfizierten) Zellen und Laminin keine Präferenz und wuchsen ungerichtet über beide Membranstreifen (Abb. 4b und 4c).

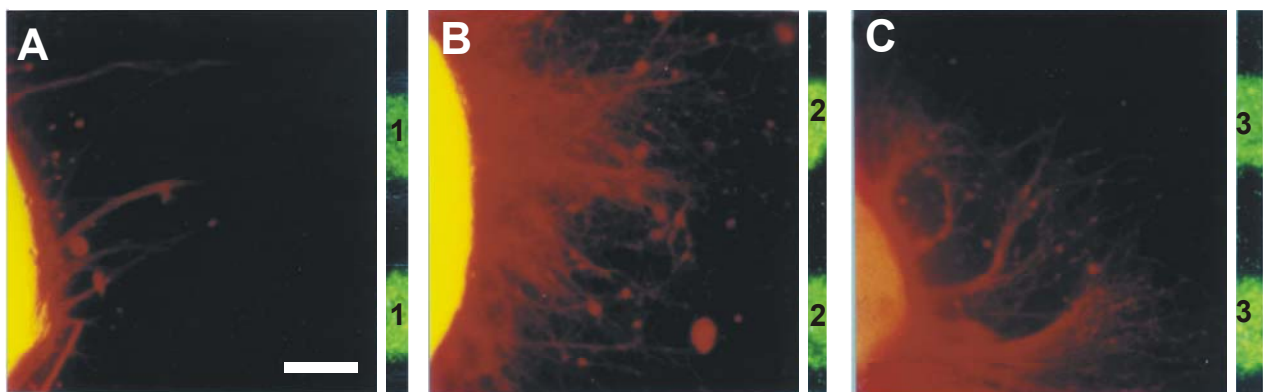


Abb.4:

Zielgerichtetes Auswachsen auf Ephrin Membranlinien. In A sind alternierend angeordnet Membranen von Ephrin-A3 transfizierten NIH 3T3 Zellen (grüne Linien mit 1 markiert) und lamininbeschichteten Linien (schwarz). Entorhinale Axone meiden Ephrin-A3 Membranen und präferieren die laminin-beschichteten Linien. Dieses axonale Auswachsverhalten ist spezifisch für Ephrin-A3, da das axonale Auswachsen sowohl auf Membranen von mock-transfizierten Zellen (B) als auch auf Ephrin-A5 transfizierten Zellen (C) zufällig ist und keine Präferenz zeigt. Maßstab 100 µm.

4.2 Das Auswachsen entorhinaler Axone ist abhängig vom Zielgebiet

Um die Spezifität entorhinalen Auswachsens im Streifenassay zu testen, wurden Streifenassays mit Membranen von postnatalen Hippocampi und des Cerebellums, also von einer Hirnregion, in die der entorhinale Cortex *in vivo* nicht projiziert, durchgeführt. Entorhinale Neuriten zeigten eine klare Auswachspräferenz für Membranen ihrer *in vivo*

Zielregion (Abb. 5a). Als eine weitere Kontrolle zum Testen der Auswachsspezifität wurde das Auswahlverhalten von Neuriten untersucht, die *in vivo* nicht zum Hippocampus projizieren. Auswachsende Axone von Motorcortex-Explantaten zeigten keine Auswachspräferenz zwischen hippocampalen und cerebellären Membranen und kreuzten beide Membranstreifen frei (Abb. 5b).

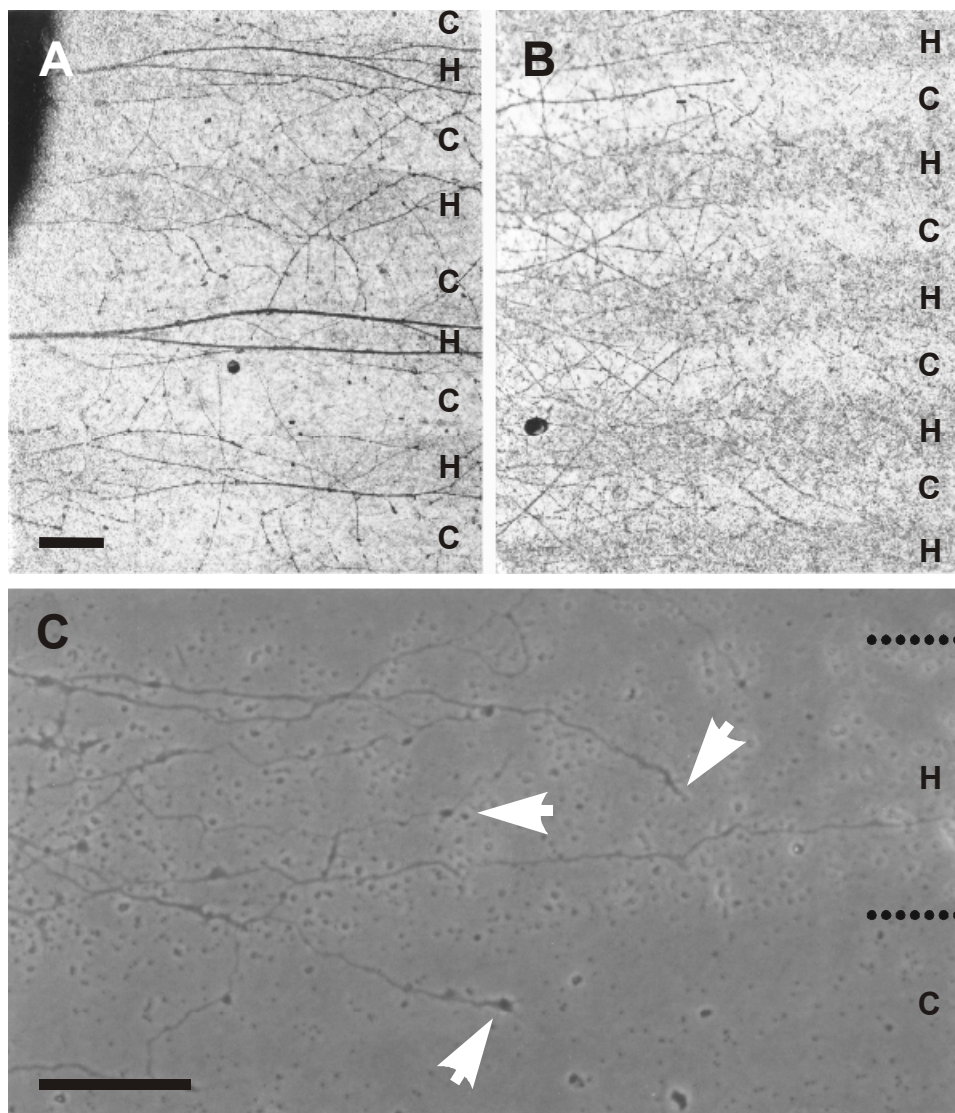


Abb. 5:

Zielgerichtetes Auswachsverhalten entorhinaler Axone auf hippocampalen Membranen. In A ist ein entorhinales Explantat auf alternierenden Membranen von postnatalen Hippocampi (H) und Cerebellum (C) kultiviert. Entorhinale Axone zeigen eine deutliche Präferenz für ihr natürliches Zielgebiet, den Hippocampus, und meiden Membranen von Cerebellum. In B wurde auf der gleichen Membrananordnung ein Explantat vom Motorcortex kultiviert. Corticale Axone zeigen keine Präferenz und kreuzen beide Membranlinien frei. C ist eine Vergrößerung aus A. Die Pfeile zeigen auf die axonale Endaufreibung, den sogenannten Wachstumskolben. Maßstab in A 90 µm, in C 100 µm.

Verteilung von axonalen Auswahlverhalten für postnatale hippocampale Membranen							
	Kategorie des axonalen Auswahlverhaltens						
Entwicklungsstadien im Vergleich	Nicht Klassifiziert	Präferenz für alternative Membranen	Keine Präferenz/ zufälliges Auswachsen	Leichte Präferenz für postnatale Membranen	Klare Präferenz für postnatale Membranen	n	Signifikanz des Auswahlverhaltens
P0 vs E16	2	2	33	3	0	40	n.s.
P0 vs P5	1	2	14	3	0	20	n.s.
P0 vs P10	2	0	14	5	1	22	p=0.05
P0 vs P15	5	0	4	5	9	23	p=0.05
P0 vs P30	1	0	2	3	8	14	p=0.05
P0 vs A	2		7	5	26	40	p=0.05

Tab.3:

Zielgerichtetes axonales Auswachsen von entorhinalen Explantaten. In diesem Streifenassay Setup wurde das axonale Auswachsverhalten auf hippocampalen Membranen verschiedener Entwicklungsstadien getestet. E16, embryonal Tag 16; P, postnatal Tag 0, 5, 10, 15, 30; A, adult; n.s., nicht signifikant (chi-Quadrat Test).

4.3 Das Auswachsen entorhinaler Axone ist abhängig von der Maturation seines Zielgebiets, des Hippocampus

Um die Auswachspräferenz von entorhinalen Neuriten auf hippocampalen Membranen aus Zeitstadien vor, während und nach der Etablierung entorhino-hippocampaler Verbindung *in vivo* zu testen, wurden entorhinale Explantate von P0 Ratten auf hippocampalen Membranen von frühembryonalen (E16), postnatal Tag 5, 10, 15, 30 und adulten Ratten kultiviert (Abb. 6, in Tab. 3 zusammengefasst).

Auswachsende Neuriten von entorhinalen Explantaten präferierten Membranen von P0 versus E16 Hippocampi, ein Zeitpunkt, wo noch keine entorhinale Fasern in den Hippocampus ziehen (n = 40). In der Kombination P0 versus P5 hippocampaler Membranen zeigten entorhinale Neuriten keine Präferenz und kreuzten die Membranstreifen frei (n = 20). Auch in der Situation P0 versus P10 zeigten entorhinale Axone ein zufälliges Auswachsmuster (n = 22). Eine erneute Präferenz für frühpostnatale hippocampale Membranen wurde erst wieder in der Kombination P0 versus P15 beobachtet (n = 23). In weiteren Streifenassay Experimenten, in denen frühpostnatale Membranen in Kombination mit hippocampalen Membranen aus älteren Tieren von postnatal Tag 30 (n = 14) bis adult (n = 40) verglichen wurden, zeigten entorhinale Axone eine klare Präferenz für frühpostnatale hippocampale Membranen. Diese

Resultate indizieren, dass das Auswachsverhalten entorhinaler Axone abhängig ist vom Maturationsstadium des hippocampalen Zielgebiets.

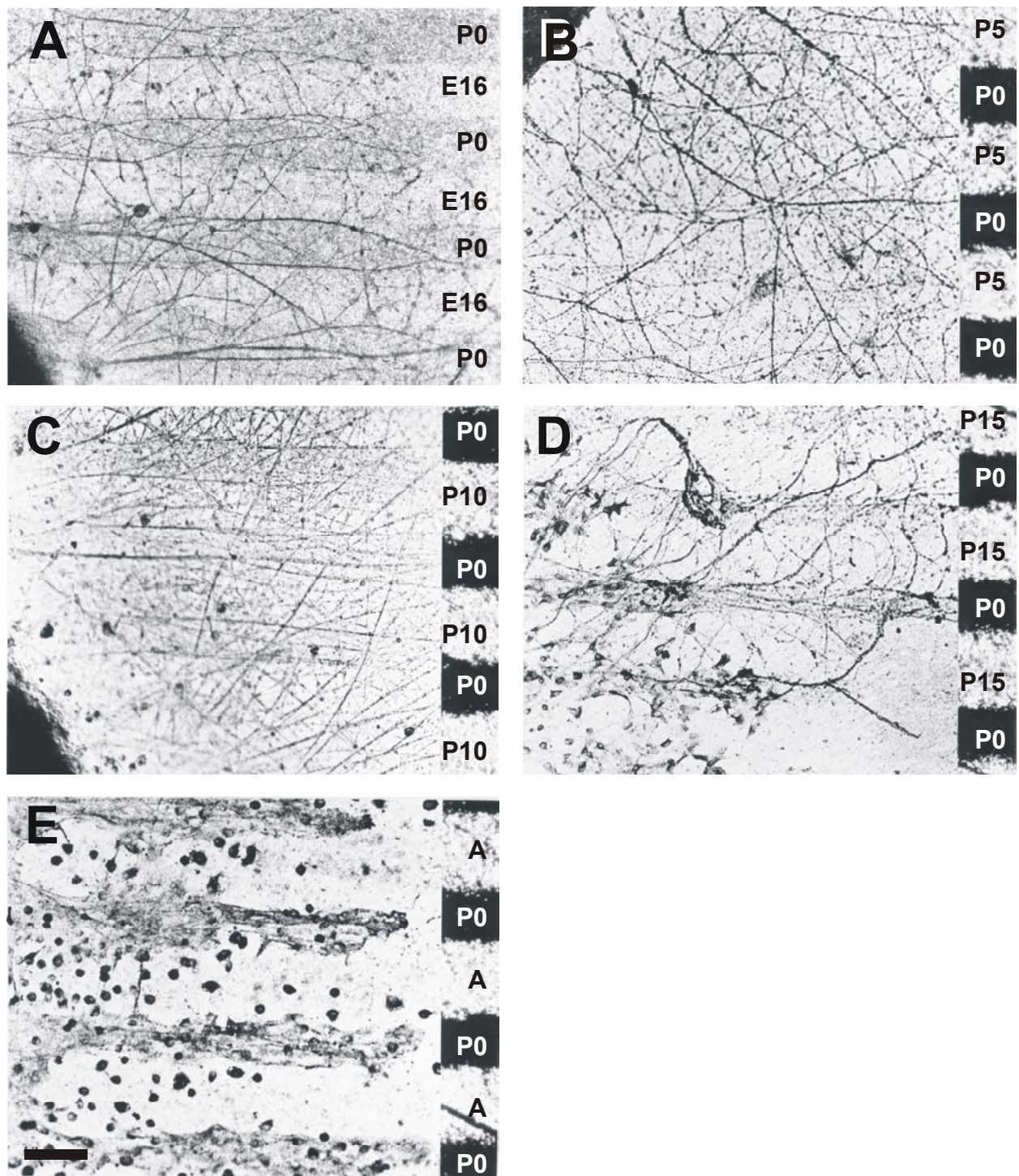


Abb. 6:

Zielgerichtetes axonales Auswachsen auf hippocampalen Membranen verschiedener Entwicklungsstadien. Entorhinale Explantate wurden auf alternierenden Membranen von Hippocampi verschiedener Entwicklungsstadien kultiviert und Axone mittels MAP-1 Immunhistochemie dargestellt. Im Vergleich E16 versus P0 zeigen entorhinale Axone eine Auswachspräferenz für postnatale Hippocampus-Membranen (A). In B, C und D zeigen entorhinale

Axone keine Auswachspräferenz und kreuzen die alternierenden Membranlinien ungerichtet. Entorhinale Explantate, die auf Membranen von postnatalen (P0) und adulten (A) Hippocampi kultiviert wurden, zeigen wieder zielgerichtetes Auswachsen und präferieren die frühpostnatalen Hippocampusmembranen (E). Maßstab 110 μm .

Um das maturations-abhängige Auswachsverhalten entorhinaler Axone mit dem Myelinisierungsprozess zu korrelieren, wurden Hippocampi verschiedener Entwicklungsstadien auf die Expression von zwei myelin-spezifische Proteine (MBP und MAG) immunhistochemisch untersucht. Die Myelinmarker MBP und MAG sind Hauptkomponenten des Myelins im ZNS (Smith, 1992). MBP und MAG immunpositive Strukturen fanden sich in den Strata radiatum und lacunosum-moleculare des Hippocampus und in den Molekularschichten des Gyrus dentatus von P15 an. Die Immunreaktivität war maximal ab P60 (Abb. 7).

4.4 Myelin hat einen starken inhibitorischen Effekt auf die axonale Auswachslänge

Um die Auswachslängen von entorhinalen Axonen auf Myelin und hippocampalen Zellmembranen von verschiedenen Entwicklungsstadien zu quantifizieren, wurden entorhinale Explantate auf Nuclepore Filter mit nur einzelnen Membranstreifen kultiviert, die alternierend mit einem substratfreien Zwischenraum angeordnet waren (siehe hierzu auch 2.3). Das Längenwachstum entorhinaler Axone auf Membranen adulter Hippocampi war gering, während auf frühpostnatalen hippocampalen Membranen entorhinale Neuriten weitaus länger auswuchsen (Abb. 8, 9). Auf Membranen adulter Hippocampi, denen durch physikalische Separation der Myelinanteil entfernt wurde, war das Längenwachstum entorhinaler Neuriten dreimal länger im Vergleich zu adulten hippocampalen Membranen, während die Auswachslängen entorhinaler Axone auf adulten hippocampalen Membranen, die mit dem Antikörper IN-1 präinkubiert wurden, zwischen den beiden Messungen lag (Abb. 8 C, 9 A). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Nogo-A (der vom Antikörper IN-1 neutralisiert wird) nicht der einzige wachstumsinhibitorische Faktor des Myelins ist (McKerracher et al., 1994; Mukhopadhyay et al., 1994; Lozano et al., 1995; Chen et al., 2000). In Experimenten, in denen ein Kontrollantikörper verwendet wurde, der keine Spezifität für Myelinproteine hat, konnte kein Effekt auf das axonale Längenwachstum beobachtet werden (Abb. 9 B). Myelin selbst zeigte einen starken wachstumsinhibitorischen Effekt auf auswachsende Axone. Entorhinale Axone wuchsen nur spärlich auf Myelin. Das zentrale Myelin verlor stark am auswachsinhibitorischen Effekt, wenn es mit IN-1 präinkubiert wurde,

und entorhinale Fasern wuchsen siebenmal länger als auf unbehandelten Myelinpräparationen (Abb. 8 E, F; 9 B).

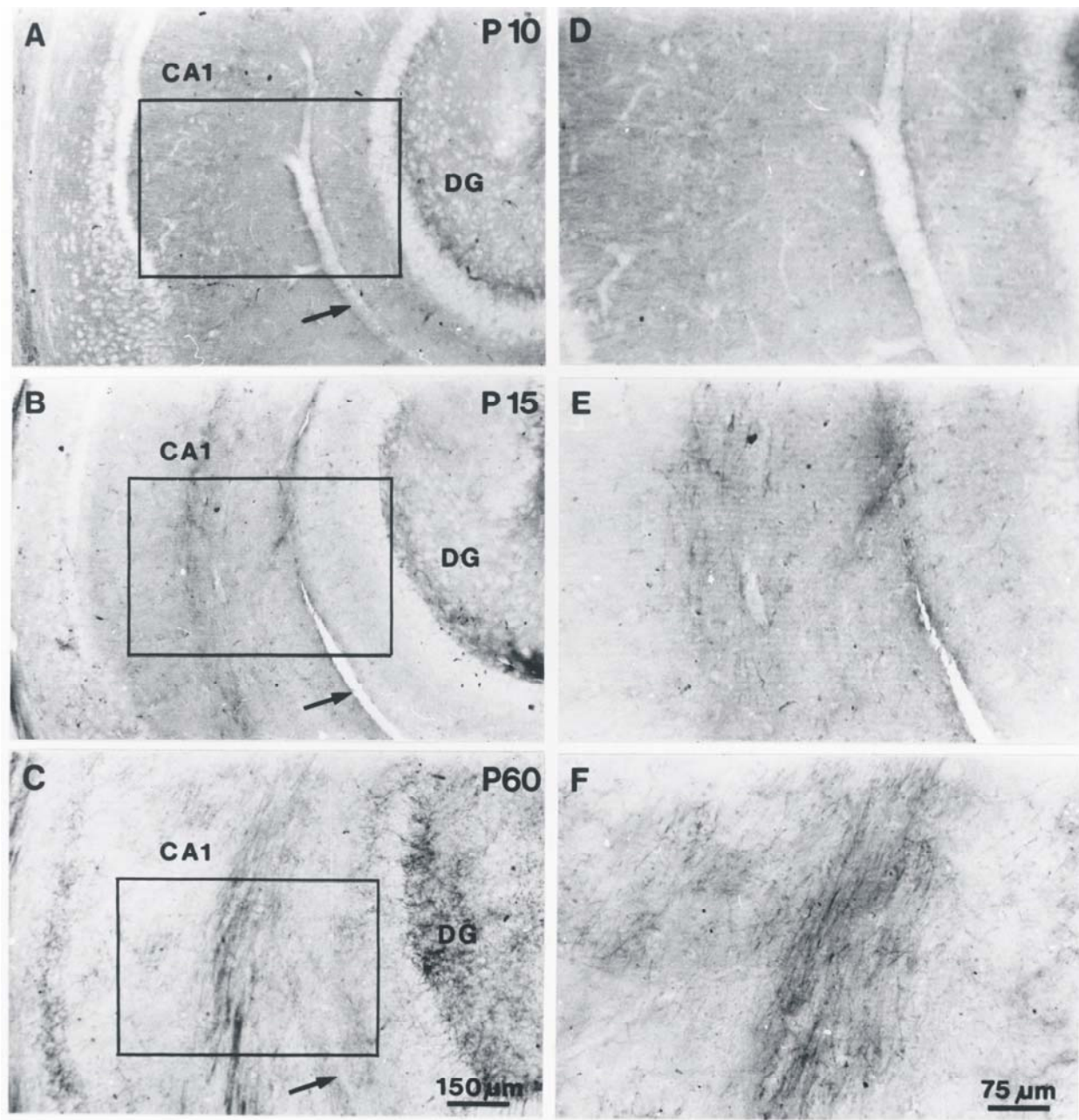


Abb. 7:

Immunohistochemischer Nachweis von Myelin Basic Protein (MBP) im Hippocampus der Ratte. D-F sind Vergrößerungen aus A-C. Pfeile zeigen auf die hippocampale Fissur. Bei postnatal Tag 10 (P 10) und jünger ist keine MBP Immunreaktivität detektierbar (A, D). Ein schwaches immunreaktives Signal ist bei P15 im Stratum lacunosum-moleculare und im infragranulären Hilus sichtbar (B, E). Im adulten Hippocampus (P 60 und älter) ist ein starkes immunpositives Signal im Stratum lacunosum-moleculare, in der Molekularschicht des Gyrus dentatus (DG) und in der infragranulären Hilusregion detektierbar (C, F).

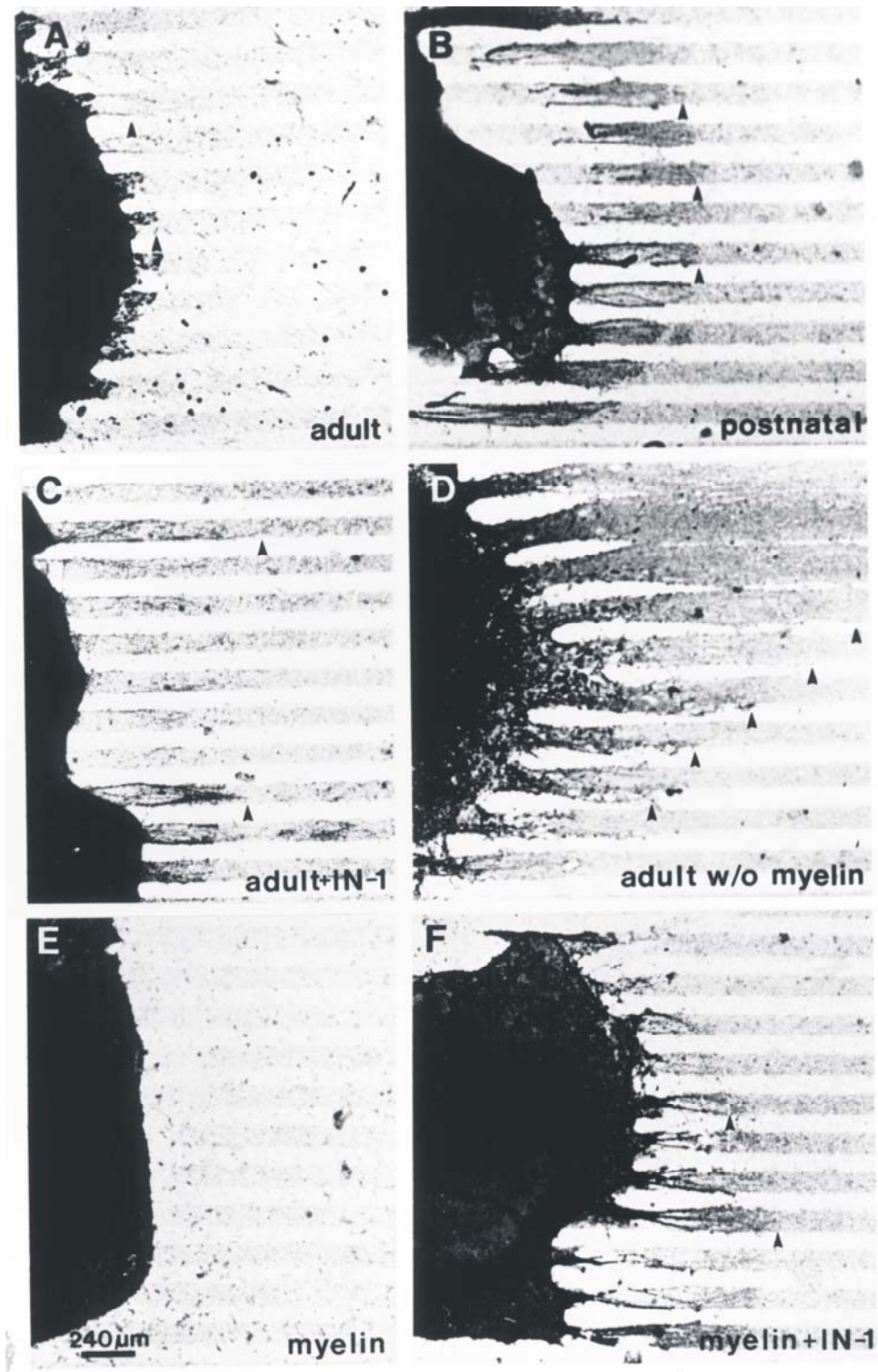


Abb. 8:

Auswachsassay von entorhinalen Explantaten auf myelinisierten Membranfraktionen. Axonwachstum auf adulten (A) und postnatalen (B) Hippocampusmembranen. In C und F wurden die Membranfraktionen mit den IN-1 Antikörper vorinkubiert, in D wurde Myelin aus der Hippocampus-Membranfraktion physikalisch entfernt.

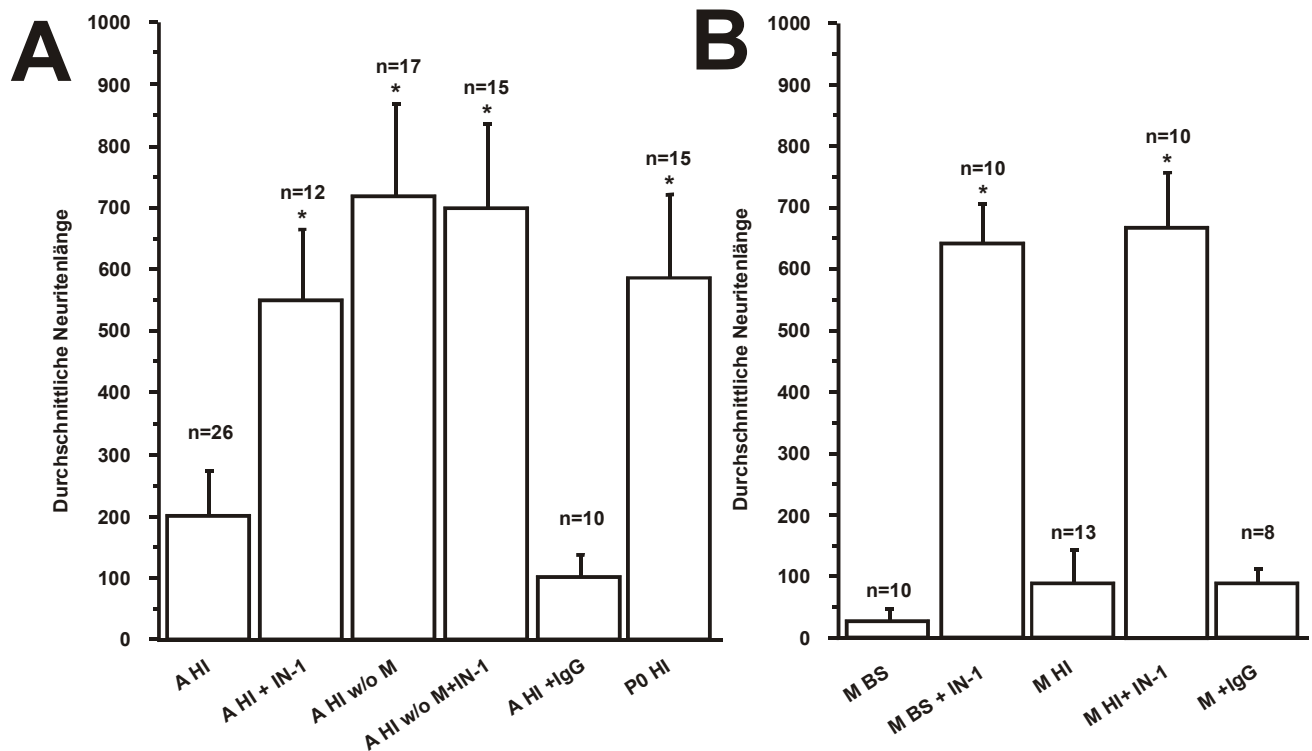


Abb. 9:

Axonales Längenwachstum auf unterschiedlichen Membranfraktionen. In A sind die Auswuchstests mit Membranen aus dem Hippocampus, in B mit unterschiedlichen Myelinfraktionen zusammengefasst. Die mit einem Stern (*) markierten Säulen zeigen einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu adulten Hippocampus-Membranen (A) oder zu Myelin aus Hirnstammgewebe (M BS) (Mann-Whitney U-Test, $p \leq 0,001$). n = Anzahl der Explantate.

4.5 Myelin beeinflusst nicht das axonale Auswahlverhalten

Um der Hypothese experimentell nachzugehen, dass adulte hippocampale Membranen ein weniger attraktives Substrat darstellen wegen der auswachsinhibitorischen Effekte des Myelins, wurden Streifenassays mit angereicherten Myelin und P0 hippocampalen Membranen durchgeführt (Tab. 4). Entorhinale Axone zeigten eine klare Präferenz für P0 hippocampale Membranen über Membranen aus gereinigten Myelinfraktionen ($n = 11$). Dieses Auswuchsverhalten bestand auch, wenn die Myelinpräparation mit dem Antikörper IN-1 präinkubiert wurde ($n = 12$, Tab. 4). In Streifenassay Experimenten mit P0 und adulten hippocampalen Membranen, die mit dem Antikörper IN-1 präinkubiert wurden, zeigten entorhinale Axone weiterhin eine klare Auswuchspräferenz für Membranen von frühpostnatalen Hippocampi ($n = 37$, Abb. 10). Unter der Annahme, dass IN-1 nicht alle auswachsinhibitorischen Faktoren des Myelins neutralisiert, wurden entorhinale Explantate auf alternierenden Streifen von frühpostnatalen und adulten, myelinfreien hippocampalen

Membranen kultiviert. Entorhinale Axone zeigten weiterhin eine eindeutige Präferenz für frühpostnatale hippocampale Membranen (Tab. 4). Obgleich viele Arbeitsgruppen gezeigt haben, dass junges postnatales Hirngewebe wesentlich stärker das Auswachsen von Neuriten fördert als adultes, ein Phänomen, das der Myelinisierung zugeschrieben wurde, zeigten entorhinale Axone eine Auswachspräferenz für postnatale hippocampale Membranen über adulten hippocampalen Membranen, unabhängig von der Präsenz von Myelin.

Verteilung von axonalen Auswahlverhalten für postnatale hippocampale Membranen							
	Kategorie des axonalen Auswahlverhaltens						
	Nicht klassifiziert	Keine Präferenz/zufälliges Auswachsen	Präferenz für myelinhaltige Membranen	Leichte Präferenz für postnatale Membranen	Klare Präferenz für postnatale Membranen	n	Signifikanz des Auswahlverhaltens
P0vs.M	0	2	0	1	8	11	p=0.05
P0vs.M IN-1 treated	1	1	0	2	8	12	p=0.05
P0vs.A IN-1 treated	6	8	5	16	2	37	p=0.05
P0vs.A w/oM	3	4	0	13	1	21	p=0.05

Tab.4:

Myelin und zielgerichtetes axonales Auswachsen. Entorhinale Explantate wurden auf alternierenden Membranlinien von frühpostnatalen und adulten Hippocampi sowie auf Myelin kultiviert und deren zielgerichtetes Auswachsen nach den Kriterien von Bähr & Wizenmann (1996) ausgewertet (chi-Quadrat Test).

4.6 Der Einfluss von Membranen deafferenzierter Hippocampi auf das gerichtete axonale Auswachsen

Regulieren membran-assoziierte Faktoren nach Deafferenzierung in den betroffenen Regionen das Einwachsen aussprossender Fasern? Um dieser Frage nachzugehen, wurden Streifenassay Experimente mit Membranen von adulten, nichtlädierten und deafferenzierten Hippocampi durchgeführt. In Experimenten mit Membranstreifen von vier Tagen nach entorhinaler Cortex Läsion (ECL) entnommenen Hippocampi, ein Zeitstadium in dem Degenerationsprozesse und gliale Reaktionen überwiegen, und Hippocampi von adulten Kontrolltieren, zeigten entorhinale Explantate ein zufälliges Auswachsen ohne Präferenz für einen der beiden Membranstreifen (Tabl. 5, Abb. 11). In einem nächsten Schritt wurden hippocampale Membranen aus einem Läsionsstadium, in dem Sproutingprozesse überwiegen, im Streifenassay mit adulten Hippocampusmembranen verglichen.

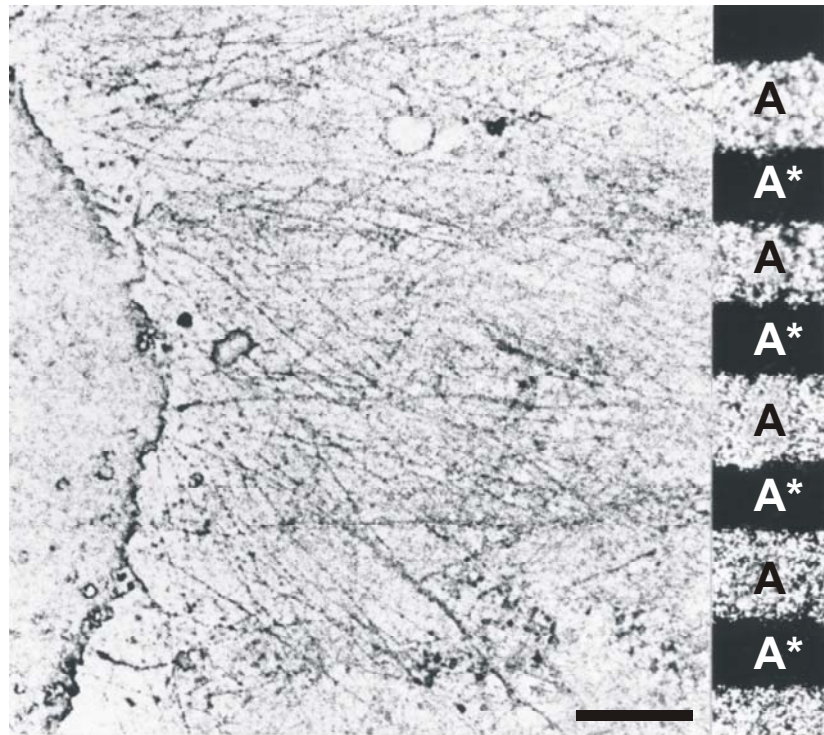


Abb. 10:

Axonales Auswachsverhalten auf alternierenden Membranen von adulten Hippocampi. Die mit A* markierten Linien sind myelinfreie adulte Hippocampusmembranen. Entorhinale Axone zeigen keine Präferenz und kreuzen die alternierenden Linien ungerichtet. Maßstab 135 µm.

In der Membrankombination adulter Hippocampus versus Hippocampus 10 dal zeigte sich eine Auswachspräferenz von entorhinalen Axonen für Membranen aus dem deafferenzierten Hippocampus (Tabl. 5, Abb. 11 C). Diese Auswachspräferenz für Membranen von lädierten Tieren war in weiteren Läsionsstadien, 20 dal, 30 dal und 80 dal, nicht detektierbar im Vergleich zu Membranen von adulten nichtlädierten Tieren (Abb. 11 C, D, E, zusammengefasst in F).

4.7 Auswachslängen entorhinaler Axone auf Membranen deafferenzierter Hippocampi

Um den Einfluss von Membranen deafferenzierter Hippocampi auf das axonale Längenwachstum zu analysieren, wurde der Längenauswachstest angewandt. Entorhinale Explantate wurden auf Nuclepore Filtern mit Membranstreifen kultiviert, die alternierend mit einem substratfreien Zwischenraum angeordnet waren. Auf adulten hippocampalen Membranen wuchsen entorhinale Axone nur spärlich (Abb. 12 A, 13). Auswachslängen entorhinaler Neuriten stiegen über postläsionale Stadien von 4 dal (Abb. 12 B, 13), bis zu

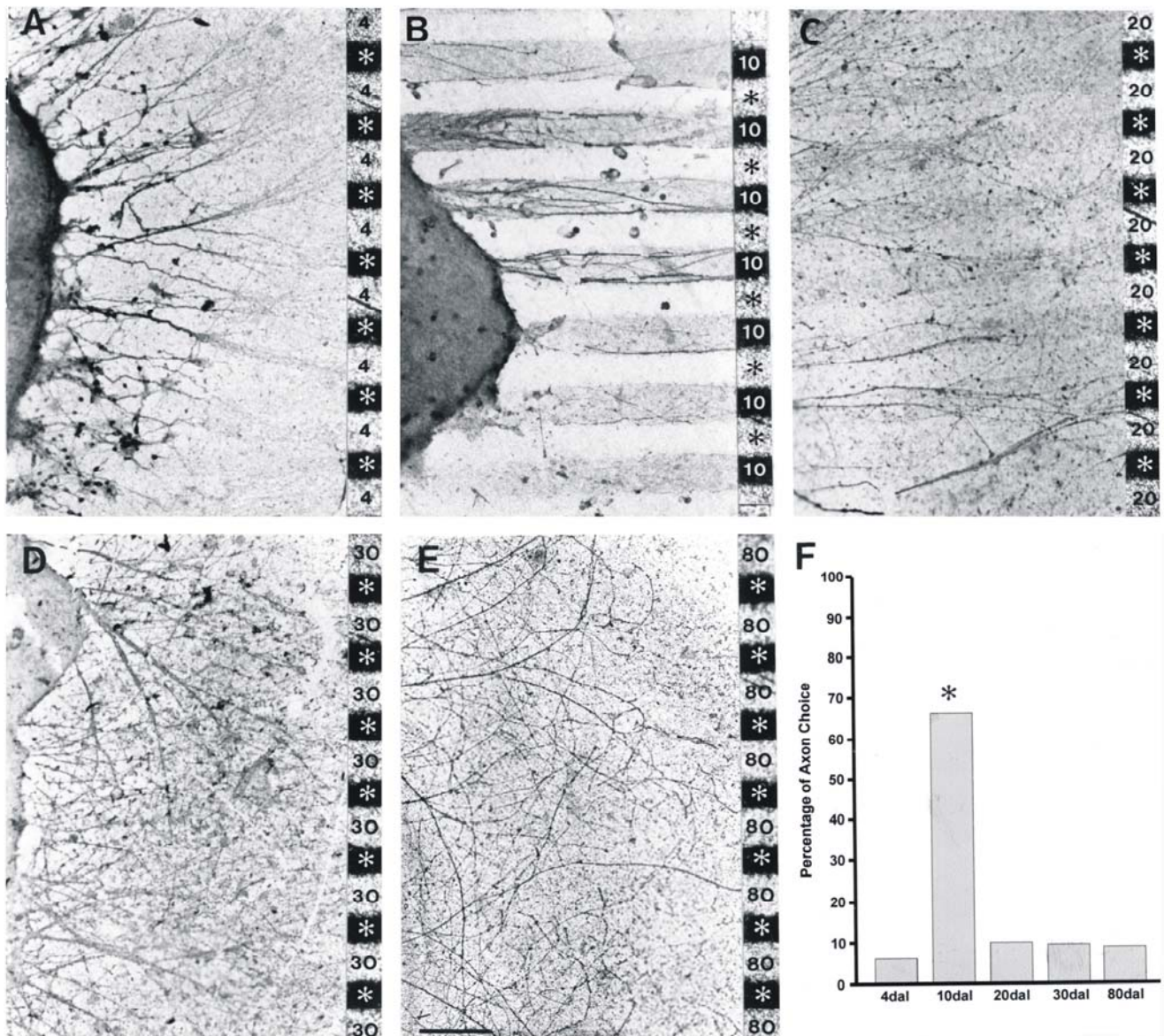


Abb. 11:

Axonales Auswuchsverhalten auf hippocampalen Membranen verschiedener Läsionsstadien. Entorhinale Explantate wurden auf alternierenden Membranen von Hippocampi verschiedener Läsionsstadien kultiviert und Axone mittels MAP-1 Immunhistochemie dargestellt. Membranen von adulten nichtlädierten Hippocampi sind mit *, die verschiedenen Läsionsstadien mit Zahlen in Tagen nach Läsion (dal) markiert. Entorhinale Axone zeigen in der Kombination adult versus 10 dal eine Auswachspräferenz für die deafferenzierten Hippocampusmembranen (B). In A, C, D und E zeigen entorhinale Axone keine Auswachspräferenz und kreuzen die alternierenden Membranlinien frei. In F sind die Daten graphisch zusammengefasst. Die mit einem Stern (*) markierte Säule zeigt einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu adulten Kontrollmembranen (chi-Quadrat Test, $p \leq 0,05$). Maßstab 150 μm .

einem statistisch signifikanten Maximum bei Membranen von Hippocampi 10 dal (Abb. 12C, 13). Das verstärkte Längenwachstum entorhinaler Axone auf deafferenzierten hippocampalen

Membranen war signifikant bei 20 dal (Abb. 12 D) und 30 dal (Abb. 12 E). Entorhinale Explantate, die auf Membranen von deafferenzierten Hippocampi 80 dal kultiviert wurden, zeigten keine signifikanten Unterschiede ihrer Auswachslänge im Vergleich zu nichtlädierten, adulten hippocampalen Membranen (Abb. 12 F, Abb. 13).

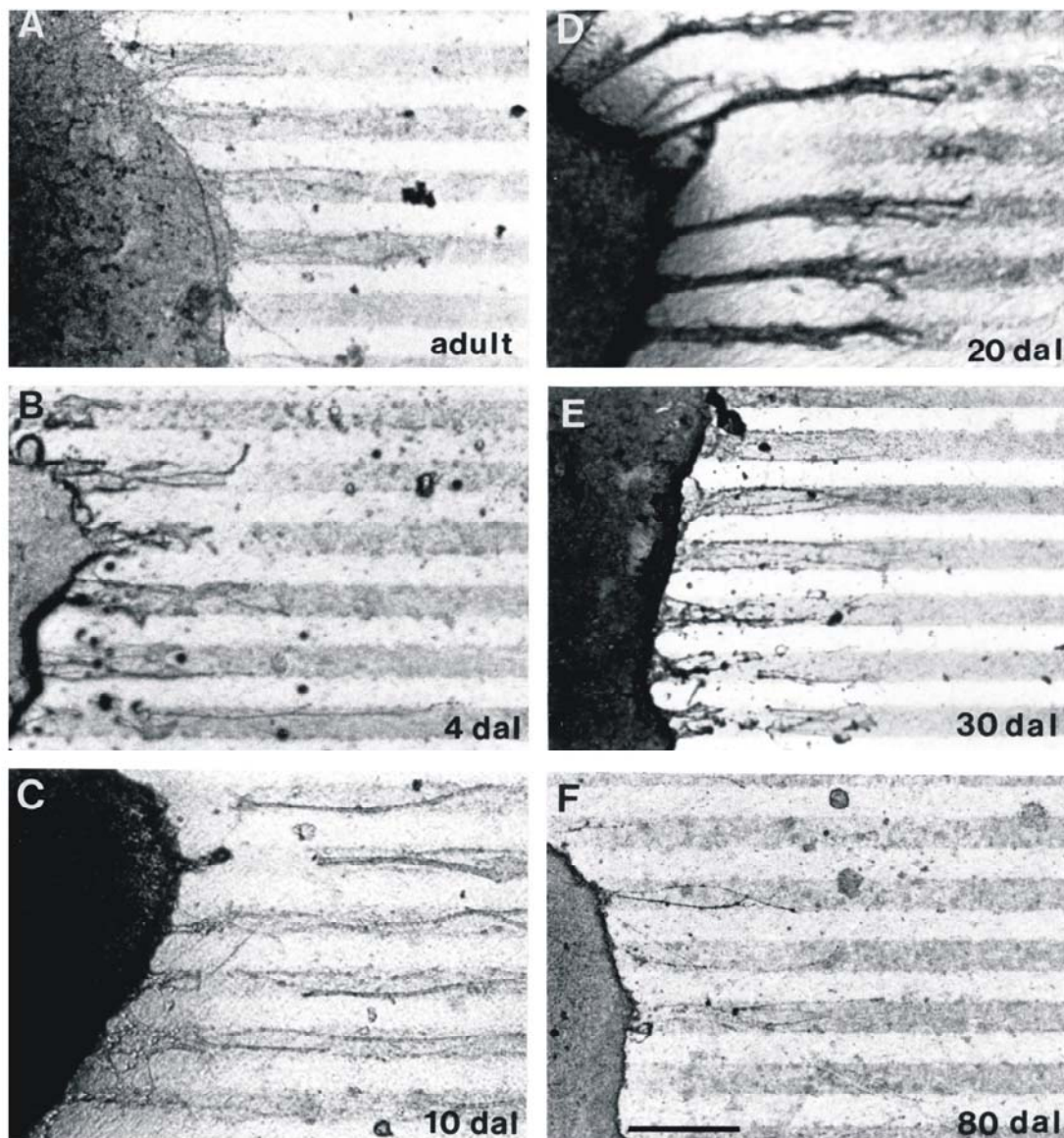


Abb. 12:

Axonales Längenwachstum auf Membranfraktionen verschiedener Läsionsstadien. Entorhinale Explantate wurden kultiviert auf Hippocampusmembranen von adulten Kontrolltieren (A), 4 (B), 10 (C), 20 (D), 30 (E) und 80 (F) Tage nach Läsion (dal). Maßstab 200 μm .

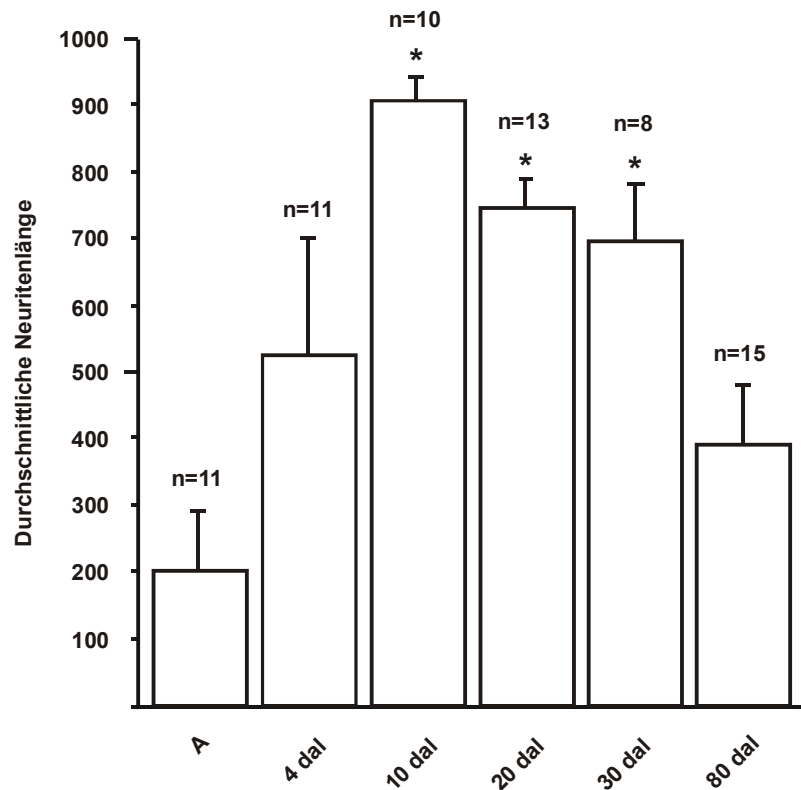
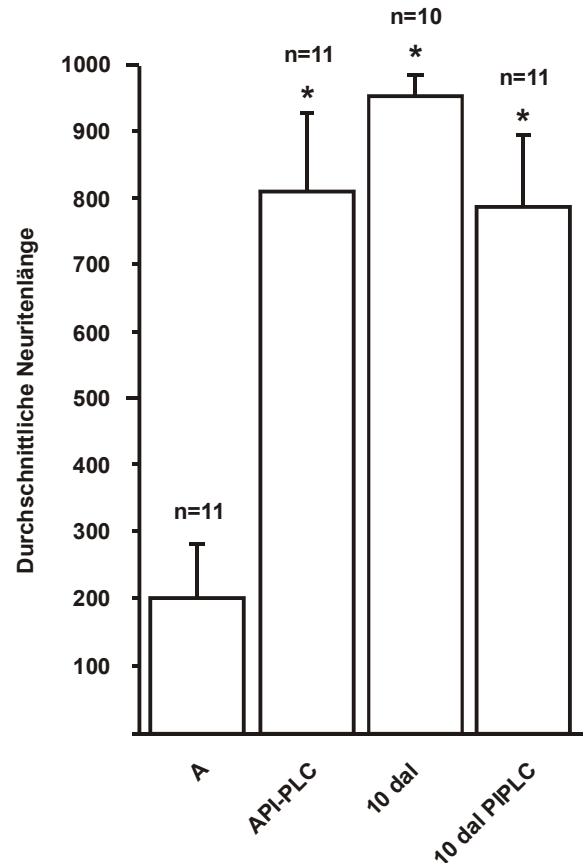


Abb. 13:

Axonales Längenwachstum entorhinaler Explantate auf Hippocampus-Membranen verschiedener Läsionsstadien. Das Säulendiagramm fasst die mittleren axonalen Auswachslängen aus dem Auswachslängenassay zusammen. Die mit einem Stern (*) markierten Säulen zeigen einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu adulten Hippocampusmembranen (Mann-Whitney U-Test, $p \leq 0,001$). n = Anzahl der Explantate.

4.8 Phospholipase Behandlung von Membranen adulten Hippocampi fördert das axonale Längenwachstum

PI-PLC Behandlung von adulten hippocampalen Membranen verstärkte die Auswachslängen entorhinaler Axone im Vergleich zu adulten unbehandelten Membranen um den Faktor vier (Abb. 14). Bei der PI-PLC Behandlung von hippocampalen Membranen 10 dal konnte keine weitere Steigerung axonalen Wachstums induziert werden, und entorhinale Axone wuchsen auf den PI-PLC behandelten Membranen in einer vergleichbaren Länge aus, wie auf den unbehandelten Membranen 10 dal (Abb. 14). Im Streifenassay wurden entorhinale Explantate mit Streifen von adulten Hippocampusmembranen PI-PLC enzymatisch verdauten und mit Hippocampusmembranen 10 dal konfrontiert. Die PI-PLC Behandlung war nicht ausreichend, das gerichtete axonale Auswahlverhalten zu beeinflussen und entorhinale Neuriten bevorzugten weiterhin hippocampale Membranen 10 Tage nach Läsion (Abb. 15).

**Abb. 14:**

Axonales Längenwachstum mit vorbehandelten adulten Hippocampusmembranen. Entorhinale Axone wurden auf Membranen aus dem adulten Hippocampus (A), aus dem Hippocampus 10 Tage nach Läsion (10 dal), und auf Membranen, die mit Phosphatidylinositol-spezifischer Phospholipase (PI-PLC) vorbehandelt wurden. Die mit einem Stern (*) markierten Säulen zeigen einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den Auswachsängen auf adulten Hippocampusmembranen (Mann-Whitney U-Test, $p \leq 0,001$). n = Anzahl der Explantate.

4.9 Entorhinale Axone zeigen keine Präferenz zwischen postnatalen und adulten hippocampalen Membranen 10 Tage nach Läsion

In den vorangegangenen Experimenten wurde gezeigt, dass entorhinale Axone zwischen Membranen, die während der Periode, in der der Tractus perforans in den Hippocampus zieht, (E19-P10) und adulten Hippocampusmembranen ($\geq P60$) klar die erste bevorzugt. Diese Auswachspräferenz blieb auch weiterhin für P0 Membranen bestehen, wenn Myelin aus den adulten Membranen separiert wurde. In folgenden Experimenten wurde nun das Auswachsverhalten entorhinaler Neuriten analysiert, die zwischen Membranen von P0 und 10 dal Hippocampi diskriminieren konnten. In dieser Membrankombination zeigte sich keine

Präferenz für eine der Membranstreifen und die Axone kreuzten die Membranstreifen frei (Abb. 15).

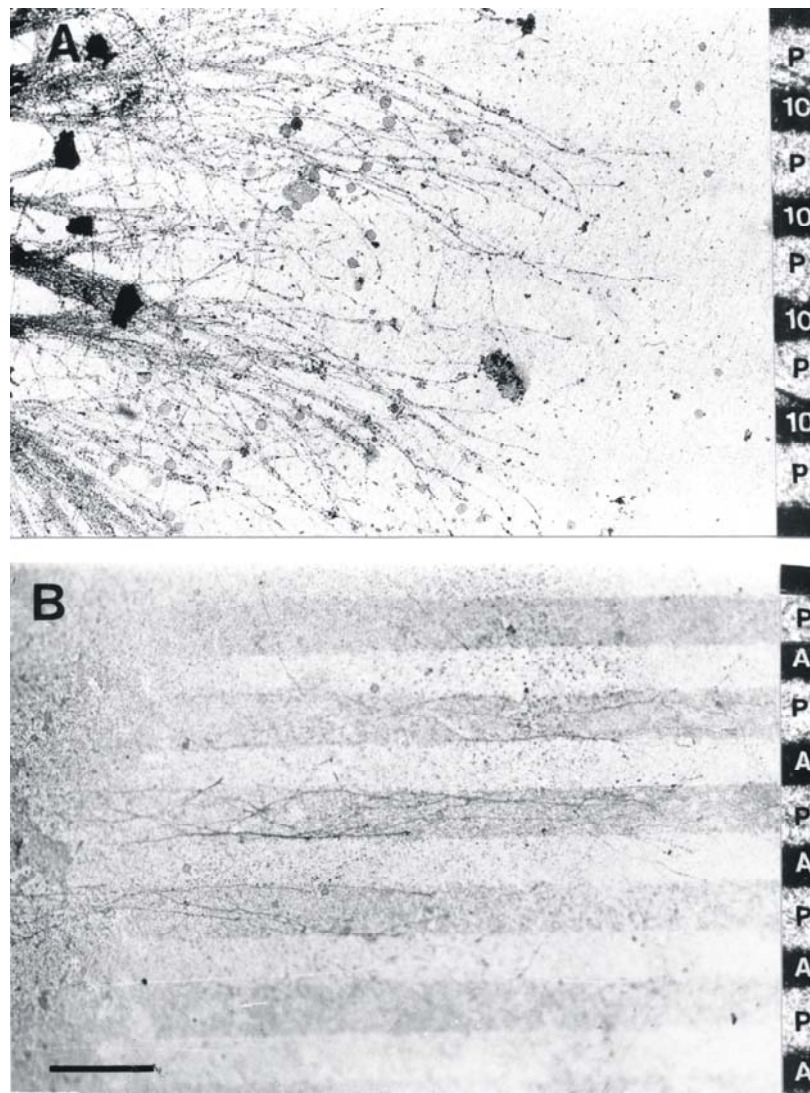


Abb. 15:

Zielgerichtetes axonales Auswachsverhalten 10 Tage nach Läsion. A Explantate vom entorhinalen Cortex wurden auf alternierenden Membranen von P0 Hippocampi und deafferentierten Hippocampi 10 Tage nach Läsion kultiviert und zeigten keine Auswachspräferenz. In B ist ein entorhinales Explantat auf alternierenden Membranen von Hippocampi frühpostnataler (P0) sowie adulter (A) Tiere kultiviert und zeigt eine deutliche Auswachspräferenz für die P0 Membranen. Maßstab 150 μ m.

5. Diskussion

5.1 Synopsis

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten zeigten, dass axonales Auswachsen entorhinaler Explantate zielgewebsspezifisch ist und durch membran-assoziierte Moleküle vermittelt wird. Experimente mit Membranen von Hippocampi unterschiedlicher Entwicklungsstadien ergaben, dass entorhinales Auswachsverhalten abhängig ist von der Maturation und weiter, dass die im Hippocampus vorliegenden Faktoren zu einem bestimmten Zeitpunkt transient vorhanden sind, nämlich während des *in vivo* Zeitpunkts der Terminierung entorhinaler Fasern in den Hippocampus und danach entweder nicht mehr exprimiert werden oder maskiert vorliegen. Im nächsten Schritt wurden die membran-assoziierten Faktoren nach einer Deafferenzierung im Hippocampus untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass tatsächlich Membranen von deafferenzierten Hippocampi axonales Längenwachstum im Vergleich zu adulten nichtlädierten Hippocampi steigerten und auch das zielgerichtete axonale Auswachsverhalten positiv beeinflusste. In weiteren Experimenten wurde evident, dass es sich um attraktive Faktoren handelt, die das Auswahlverhalten entorhinaler Axone leiten.

5.2 Membran-assoziierte Moleküle während der Entwicklung

Die präsentierten Experimente wurden durchgeführt, um zu klären, ob zielgerichtetes Auswachsen entorhinaler Axone abhängig ist von der Präsenz von Ziel- und maturationsabhängigen membran-assoziierten Molekülen, die während der entorhino-hippocampalen Entwicklung in einem räumlich-zeitlichen Kontext vorliegen. Während der Entwicklung des entorhino-hippocampalen Systems überqueren entorhinale Axone das Subiculum via Tractus perforans und invadieren ihr spezifisches Zielgebiet in einem zeitlich geordneten Prozess (Snyder et al., 1991; Del Rio et al., 1997; Skutella et al., 1999; Skutella & Nitsch, 2001). In anatomischen Studien wurde mit Hilfe des lipophilen fluoreszierenden Tracers DiI die zeitliche Sequenz der axonalen Einwachsens in den Hippocampus dargestellt (Soriano et al., 1994; Super & Soriano, 1994). Am embryonal Tag 19 erreichen die ersten entorhinalen Axone die äussere Molekularschicht des Gyrus dentatus, während postnatal Tag 1-5 die entorhinale Faserdichte in dieser Zone weiter ansteigt. Im ersten Schritt wurde das axonale Auswahlverhalten auf einen bekannten, transmembranären, GPI-verankerten repulsiven Faktor im Streifenassay getestet. Entorhinale Axone zeigten eine klare Präferenz für Laminin, wenn ihnen zugleich Ephrin-A3 angereicherte Membranen angeboten wurden. Die Spezifität dieses Auswahlverhaltens zeigte sich in Experimenten, in denen alternierend

Kontrollmembranen oder Membranen von einem weiteren Mitglied aus der Familie der Ephrine, Ephrin-A5, entorhinalen Explantaten angeboten wurde. In diesen Fällen zeigten entorhinale Axone keine Auswachspräferenz und wuchsen frei über die alternierenden Membranlinien. Der spezifische repulsive Effekt von Ephrin-A3 auf entorhinale Axone korreliert gut mit dem Expressionsmuster von Ephrin-A3 im Hippocampus. Ab embryonal Tag 19, also zu Beginn der Invasion entorhinaler Axone in den Gyrus dentatus, ist Ephrin-A3 im Gyrus dentatus exprimiert. Rezeptorbindungsstudien zeigen weiter, dass Ephrin-A3 und A5 spezifisch in der inneren Molekularschicht vorliegen und durch diese Lokalisation entorhinale Axone, die responsibel für Ephrin-A3 sind, am Einwachsen in diese Schicht hindern und so die Innervation der äusseren Molekularschicht determinieren (Stein et al., 1999). In weiteren Streifenassay Experimenten zeigte sich, dass die axonale Auswachspräferenz zielgebietsspezifisch ist, und Membranen aus Hirnregionen, die normotypisch keine Konnektivität zum entorhinalen Cortex halten, gemieden werden. Auswachsstudien mit Membranen aus Hippocampi unterschiedlicher Entwicklungsstadien ergaben, dass entorhinale Axone hippocampale Membranen aus genau der Entwicklungsphase bevorzugen, in der *in vivo* entorhinale Fasern im Hippocampus terminieren.

Diese Daten geben Hinweise dafür, dass zum Zeitpunkt der axonalen Termination im Hippocampus membran-assoziierte Moleküle vorhanden sind, die eine kontaktvermittelte Attraktivität für entorhinale Fasern vermitteln könnten. Diesen Schluss lassen weitere Experimente von Frotscher & Heimrich (1993) zu. Sie zeigten, dass das Einwachsmuster entorhinaler Fasern unabhängig der zeitlichen Anordnung efferenter Fasersysteme ist und schlossen daraus, dass in der äusseren Molekularschicht Faktoren vorliegen, die entorhinale Axone in diese Schicht lenken. Weiterhin ergaben Experimente aus der Arbeitsgruppe von M. Frotscher, dass in der äusseren Molekularschicht des Gyrus dentatus spezifische hyaluronidase-sensitive ECM Moleküle vorliegen, die die Adhäsion und das Einwachsen entorhinaler Zellen regulieren (im Microsphere Adhesion und Kokultur Assay, Förster et al., 1998, 2001). Das Glycoprotein Reelin, das von Cajal-Retzius Zellen sezerniert wird und in der Marginalzone der Hippocampusformation während der Entwicklung vorliegt, scheint nicht das entscheidende Molekül zur Terminierung der Schichtenspezifität zu sein. Im Hippocampus der Reeler Maus, der das Reelin kodierende Gen fehlt, liegt weiterhin eine korrekte entorhino-hippocampale Faserverbindung vor, mit diskreten Veränderungen von vereinzelt missgeleiteten Fasern und Formationen von abnormalen Patches (Del Rio et al., 1997; Borrell et al., 1999; Deller et al., 1999). Evidenzen für die Vermittlung der Axonwegfindung durch Cajal-Retzius Zellen selbst ergaben Experimente mit hippocampalen

Schnittkulturen, denen diese Zellen entfernt wurden. Diese Kulturen zeigten das Fehlen von normotypischen entorhinalo-hippocampalen Verbindungen (Del Rio et al., 1997; Frotscher et al., 2001).

5.3 Myelin und axonale Elongation

Die Experimente mit hippocampalen Membranen verschiedener Entwicklungsstadien ergaben, dass maturationsabhängige Faktoren die Schichtenspezifität für entorhinale Axone determinieren. Eine immunocytochemische Analyse der Myelin Marker (MBP und MAG) ergab, dass es im Laufe der Adoleszenz zu einer drastischen Zunahme von Myelin im Hippocampus kommt. Es lag daher nahe, das veränderte axonale Auswachsverhalten mit der Zunahme der Myelinisierung zu erklären. In den Längenauswachstests zeigte sich zudem ein drastischer wachstumsinhibitorischer Effekt von Myelin sowie von myelinhaltigen Membranen auf Axonen. Die wachstumsinhibitorische Komponente konnte mit dem monoklonalen Antikörper IN-1, der das myelin-spezifische Nogo-A bindet, bzw. durch physikalische Separation von Myelin aufgehoben werden (Chen et al., 2000; Huber & Schwab, 2000). Interessanterweise zeigte sich im Streifenassay, in dem man Auswachspräferenzen elongierender Axone beobachtet, dass Myelin und seine Komponenten die zielgerichtete Auswachsrichtung entorhinaler Axone nicht beeinflusste, also keine Lenkungseigenschaft besitzt. Dies ist um so erstaunlicher, da das axonale Wachstum auf Myelin im Vergleich zu postnatalen Membranen mehr als siebenfach vermindert war. Eine Erklärung für diese Befunde wäre, dass Myelin einen ganz allgemeinen wachstumsinhibitorischen Effekt mit der Eigenschaft besitzt, axonales Wachstum zu inhibieren oder zu verlangsamen, jedoch ohne die Eigenschaft, Axonen eine directionale Information zu geben. Da Myelin für eine Vielzahl von neuronalen Fasern wachstumsinhibitorisch wirkt, ist es weiterhin möglich, dass alle auswachsenden Neuriten Myelin bzw. Nogo-spezifische Rezeptoren, wie den Nogo-66 Rezeptor, auf ihren Wachstumskolben tragen. Durch eine solche ubiquitäre Verteilung würde es keine region-spezifische Rezeptor-Liganden Interaktion im Falle von Myelin geben (Raineteau & Schwab, 2001; Fournier et al., 2001; Bandtlow & Schwab, 2000; Schwab et al., 1993). Eine Interaktion von Myelinkomponenten und axonalen Lenkungsmolekülen ist möglich, jedoch zeigen die Arbeiten von Isacson & Deacon (1996) sowie Zhou et al. (1989), dass embryonale Explantate unabhängig von Myelin spezifisch in ihr normales Zielgebiet projizieren und synaptische Kontakte bilden. Diese Daten lassen demnach die Hypothese zu, dass das adulte Hirn über die Entwicklung hinaus axonale Lenkungsmoleküle latent exprimiert.

5.4 Zielgerichtetes axonales Auswachsen nach Läsion

Verschiedene Mechanismen der axonalen Zielfindung, nach denen das Neuritenwachstum geleitet wird, sind unter 1.4 vorgestellt worden (Püschel, 1996; Tessier-Lavigne & Goodman, 1996; Castellani et al., 1998; Mueller, 1999). Nach einer Läsion im ZNS steht als erste Notwendigkeit das neuronale Überleben im Vordergrund, das u. a. durch die Reexpression von neurotrophen Faktoren vermittelt wird (Conner et al., 1994; Eagle et al., 1995; Tomac et al., 1995). Nach dieser Überlebensphase folgt die Expression von attraktiven, wachstumsfördernden Molekülen, die das axonale Wachstum fördern. Um die funktionelle Restitutio ad integrum wiederzuerlangen, benötigen regenerierende Axone lokale Information, die ihnen die Innervation ihres Zielgebiets ermöglicht (Aubert et al., 1995). Nach einer entorhinalen Läsion zeigte sich, dass möglicherweise axonales Längenwachstum fördernde Moleküle und axonale Lenkungsmoleküle in Membranen von deafferenzierten Hippocampi vorhanden sind. Interessanterweise sind diese nicht oder nicht wesentlich PI-PLC sensitiv, so dass PI-PLC sensitive GPI-verankerte Moleküle für diesen Effekt ausgeschlossen werden können. Dies ist überraschend, wenn man bedenkt, dass verschiedene Zelladhäsionsmoleküle mit auswachsverstärkender Aktivität GPI-verankert sind. Dies gilt sowohl für verschiedene Isoformen von NCAM als auch für F11; TAG-1, BIG-1, ApCAM, LAMP, Kilon, und reggie-1 & 2 (Zhukarev & Levitt, 1995; Inoue & Sanes, 1997; Cremer et al., 1997; Schulte et al., 1997; Bräuer et al., 2000; für eine Übersicht siehe Brümmendorf & Rathjen, 1995). Es muss aber bedacht werden, dass auch einige repulsive Faktoren GPI-verankert sind, wie z. B. die Ephrin-A Subklasse (Zhou, 1998). Dies bedeutet, dass durch die PI-PLC Behandlung nicht nur attraktive, sondern auch repulsive membran-assoziierte Moleküle entfernt werden. Zusammengefasst lassen also die Daten vermuten, dass in Membranen von deafferenzierten Hippocampi auswachsverstärkende Moleküle und weiterhin dass in Membranen 10 dal zusätzlich Wegweiser-moleküle exprimiert sind. Es könnte auch angenommen werden, dass in adulten Kontrollmembranen eine Reihe von repulsiven Faktoren vorliegen, die nach einer Läsion transient verschwinden bzw. maskiert sind. Die Evidenzen jedoch für das Vorliegen eines oder mehrerer attraktiver Faktoren nach Läsion geben die Experimente, bei denen frühpostnatalen Membranen und Membranen 10 dal ein ebenbürtiges Auswachssubstrat für auswachsende entorhinale Axone bilden. Die zugrundeliegenden Moleküle könnten bei dem schichtenspezifischen Sprouten regenerierender Fasern nach Deafferenzierung im Hippocampus beteiligt sein. Inwieweit diese Moleküle auch während der Entwicklung des entorhino-hippocampalen Systems eine Rolle spielen, muss in weiterfolgenden Untersuchungen analysiert werden.

5.5 Reaktive Astrozyten und Extrazelluläre Matrix Moleküle nach Läsion

Nach Schädigung im adulten ZNS kommt es zum Einwandern reaktiver Astrozyten und meningealer Zellen an den Ort der Läsion und manifestiert sich als Gliaarbe (Hirsch & Bähr, 1999; Norton et al., 1992; Rose et al., 1976). Die klassische Hypothese ging davon aus, dass reaktive Astrozyten ein wachstumsinhibitorisches Milieu schaffen (Rudge & Silver, 1990; McKeon et al., 1991). In jüngeren Arbeiten zeigte sich jedoch, dass reaktive Astrozyten Moleküle reexprimieren, die sie auch in der Embryonalentwicklung transient exprimierten, so z. B. Vimentin und PSA-NCAM (Nomura et al., 2000; Abb. 16 A). Dies wurde als Reiteration von Entwicklungsprozessen nach Läsion diskutiert (Cotman et al., 1990). Weiterhin zeigten Patch Clamp Ableitungen von reaktiven Astrozyten immature elektrophysiologische Eigenschaften (einwärtsgerichtete K^+ Leitfähigkeit, Ruhemembranpotential, Eingangswiderstand), was die Hypothese der De-Differenzierung von reaktiven Astrozyten unterstützt (Schröder et al., 1999). Weitere Arbeiten geben Evidenzen, dass reaktive Astrozyten ein permissives Substrat für axonales Wachstum sind (Kawaja & Gage, 1991; Eagle et al., 1995). In neueren Arbeiten wurden von der läsionsinduzierten Expression von Tenascin-C, Neurocan und Brevican berichtet (Deller et al., 1997; Haas et al., 1999; Thon et al., 2000). Alle drei Moleküle werden von reaktiven Astrozyten schichtenspezifisch in die extrazelluläre Matrix (ECM) sezerniert, wobei die funktionelle Charakterisierung dieser Moleküle auf axonales Auswachsen noch aussteht (Deller et al., 2000). Ein weiterer Aspekt der molekularen Mechanismen schichtenspezifischen Aussprossens stellt die post-translationale Modifikation von membran-verankerten und ECM Molekülen (Abb. 16 B). Das prominenteste Beispiel für die Wirkung post-translationaler Modifikation auf das Auswachsverhalten von Neuriten ist NCAM. Erst die Polysialisierung von NCAM (auch als embryonale Form des NCAM bekannt) verstärkt das Auswachsen von Axonen (Zhang et al., 1992; Bruses & Rutishauer, 2001). Der Prozess des Lösens von Membranproteinen wird Ectodomain Shedding genannt und von Proteasen vermittelt. Die Spaltung von Laminin-5, ein Molekül der extrazellulären Matrix, durch Metalloproteasen führt zur Präsentation von Neoepitopen mit verstärkender Wirkung auf die Zellmigration (Giannelli et al., 1997; Koshikawa et al., 2000). Dieser proteaseabhängige Ectodomain Shedding Prozess wurde jüngst auch für die Modifizierung der axonalen Lenkungsmoleküle Ephrin-A2 und Netrin-1 beschrieben (Hattori et al., 2000; Galko & Tessier-Lavigne, 2000). Obwohl die Rolle des Ectodomain Sheddings im Prozess des reaktiven Sproutings nicht bekannt ist, muss man annehmen, dass nicht nur allein die Expression eines repulsiven oder

attraktiven axonalen Leitmoleküls, sondern auch deren räumlich-zeitliche Kombination und ihre post-translationale Modifikation essentiell für die Regulation aussprossender Fasern sind.

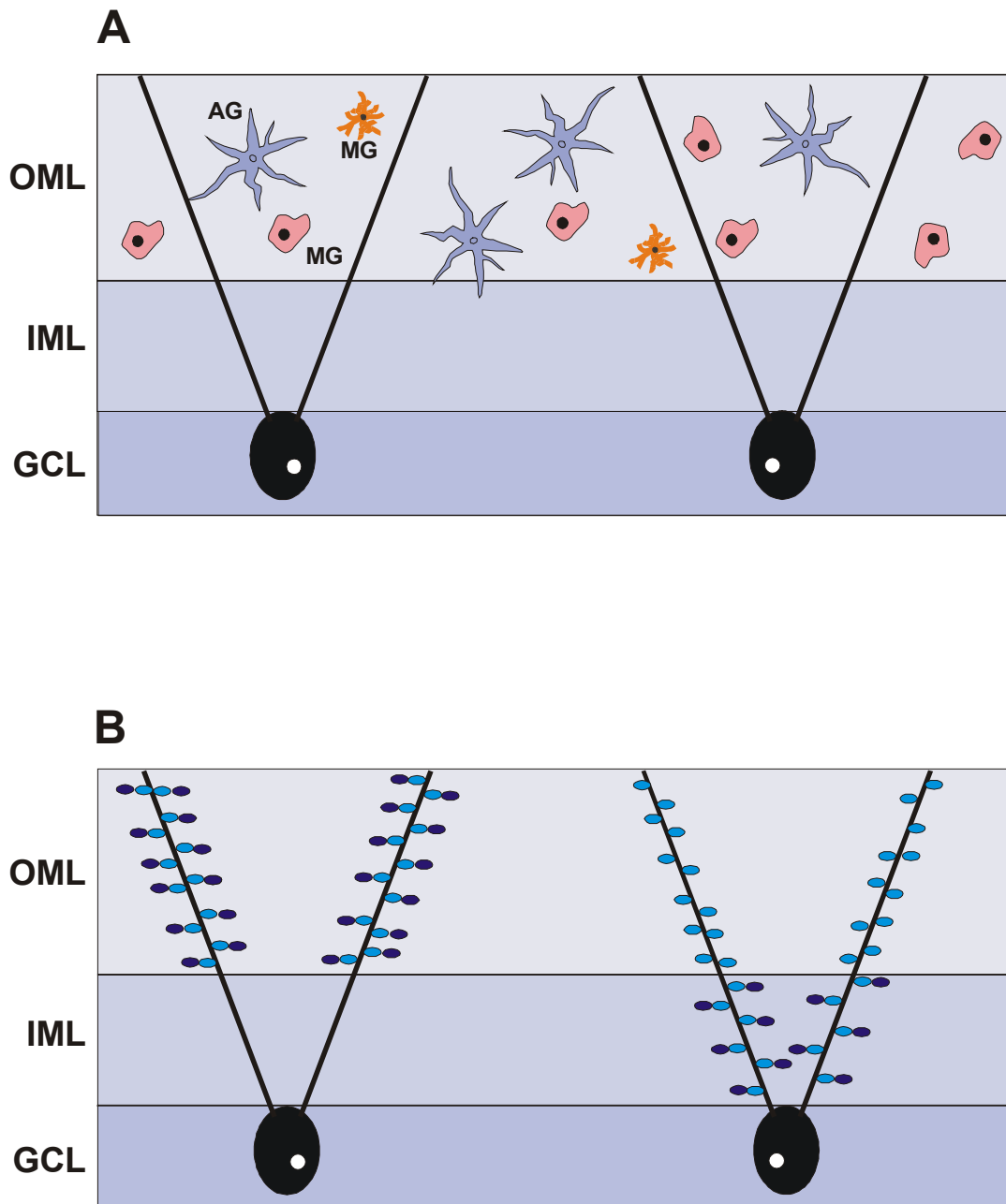


Abb. 16:

Hypothetisches Modell zur Erklärung des schichtenspezifischen Sprouting im ZNS. Stark vereinfacht dargestellt ist der Gyrus dentatus mit der Körnerzellschicht (GCL) und den apikal abgehenden Dendriten. Man unterteilt die dendritische Zone in die proximal gelegende innere Molekularschicht (IML) und weiter distal die äussere Molekularschicht (OML). Das Modell beschränkt sich auf membran-assoziierte Moleküle, die nur eine mögliche Klasse von beteiligten Molekülen darstellt. A Nach einer Läsion des Tractus perforans kommt es zu einer partiellen Deafferenzierung im Gyrus dentatus, und zwar in der äusseren Molekularschicht. Ein zeitlich feinregulierter Prozess der Aktivierung von Mikroglia (MG) und Astroglia (AG) folgt daraufhin mit einer schichten-spezifischen Migration in die denervierte Zone. Diese Zelltypen exprimieren verschiedene membran-assoziierten Moleküle im aktivierten Status. Es wird diskutiert, dass vor allem

Astroglia am schichten-spezifischen axonalen Aussprossen beteiligt sind. Entweder durch Bildung eines attraktiven und auswachsverstärkenden Milieus oder durch die Exprimierung repulsiver, wachstumshemmender Moleküle, die zu selektiven Inhibition von Fasern der inneren Molekularschicht führen, könnte Schichtenspezifität determiniert sein. Eine andere Hypothese zeigt Schema B; die Körnerzelle selbst exprimiert Moleküle auf ihren deafferenzierten Dendriten, die zur spezifischen axonalen Weg- und Zielfindung führt. Die mögliche post-translationale Modifikation von Oberflächenmolekülen ist am Beispiel der rechten Körnerzelle in B gezeigt. Ein konstitutiv exprimiertes Molekül (dunkelblaue Ovals) wird während der glialen Aktivierung durch Ectodomain Shedding modifiziert und geschnitten (violette Ovals), so dass es eine neue auswachsverstärkende Aktivität erhält und eine schichten-spezifische attraktives Milieu für auswachsende Axone darstellt.

5.7 Axonales Aussprossen und Regeneration?

Seit den bahnbrechenden Arbeiten von Ramon y Cajal zur Entwicklung und Regeneration des adulten ZNS stellt sich die Frage, welche funktionelle Konsequenz das axonale Aussprossen nach einer Schädigung für den verletzten Organismus hat (Ramon y Cajal, 1929). Ist das reaktive Aussprossen ein Prozess, der ein notwendiger Kompensationsmechanismus für den Organismus ist und zu einer Restitutio ad integrum führt? Oder führt das Aussprossen gar zur atypischen Konnektion mit nachteiligen Folgen für den Organismus über das Maß des primären axonalen Verlusts hinaus? Im Fall der Alzheimer Krankheit zeigt sich, dass die Frage der Konsequenz der Axonaussprossung eng mit der Frage der Spezifität des axonalen Aussprossens verknüpft ist. Im Verlauf dieser Erkrankung kommt es zu einem langsam fortschreitenden Nervenzellverlust mit subsequenten Verlust von Synapsen in nachgeschalteten Hirnarealen (Braak & Braak, 1990). Überlebende Nervenzellen kompensieren diesen Nervenzellverlust durch das Aussprossen neuer Axonkollateralen. Interessanterweise zeigte sich, dass es in der direkten Umgebung der extrazellulären Amyloidablagerung zu aberranten, pathologischen axonalen Wachstumsprozessen kommt (Geddes et al., 1986; Arendt, 2001). Diese Befunde des aberranten Axonwachstums fanden sich auch in transgenen Mäusen, die ein mutiertes humanes Amyloid Precursor Protein (APP23) überexprimieren (Phinney et al., 1999). Ein weiteres Beispiel für atypische, pathologische Verschaltungen durch Axonsprossung zeigte die Arbeit von Woolf et al. (1992). Nach Verletzung eines peripheren Nerven kommt es zu Aussprossung sensibler Fasern im Rückenmark mit fehlgeschalteten Anschluss an Schmerzbahnen, was zu starken Schmerzen bei leichten Berührungen führt.

Die Zielspezifität aussprossender Axone ist also eine notwendige Voraussetzung für eine funktionelle Regeneration.

Ein trauriges Beispiel für die Folgen von verlorengegangenen Nervenverbindungen stellen Schädel-, Hirn- und Rückenmarksverletzungen dar, die mit einer Inzidenz von 250-300 pro

100 000 Fällen pro Jahr auftreten. Durch den Einsatz von sogenannten genetic forward approaches, wie das Differential Display oder die Subtraktive Hybridisierung, wird zukünftig die Identifizierung und Charakterisierung der an dem schichten-spezifischen Sprouting beteiligten Moleküle im Vordergrund stehen. Mit der Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen der axonalen Wegfindung und der Zielspezifität ist die Hoffnung verknüpft, dass von diesen Erkenntnissen diese Patienten zukünftig profitieren werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit behandelte den Einfluss von membran-assoziierten Faktoren im Hippocampus auf das axonale Wachstum, zum einen während der Entwicklung des entorhino-hippocampalen Systems und zum anderen nach Deafferenzierung des adulten Hippocampus. Mit Hilfe des Streifenassays und des Längenauswachsassays wurden zuerst die maturationsabhängigen Eigenschaften von membran-assoziierten Faktoren im Hippocampus getestet. Es zeigte sich, dass entorhinale Axone zwischen ihrem normotypischen Zielgebiet und Kontrollregionen diskriminieren können und bevorzugt auf Membranen ihres Zielgebiets wachsen. Im Folgenden wurden dann Axonen hippocampale Membranen unterschiedlicher Entwicklungsstadien im Streifenassay angeboten. In diesem experimentellen Ansatz wuchsen entorhinale Axone präferenziell auf jenen hippocampalen Membranen, die aus dem Entwicklungsstadium stammen, in den die entorhinalen Fasern *in vivo* in den Hippocampus einwachsen. Diese Experimente ergaben, dass das *in vivo* zeitlich genau regulierte Einwachsen entorhinaler Fasern in den Hippocampus von membran-assoziierten Faktoren determiniert ist und ein Zeitfenster für das Vorhandensein dieser Faktoren im Hippocampus existiert.

Eines der wesentlichen Charakteristika der Maturation des zentralen Nervensystem ist die Bildung von Myelin und die Myelinisierung von Fasertrakten. Immunozytochemische Analysen mit Myelin-spezifischen Markern ergaben, dass dieses maturationsabhängige Auswachsverhalten zeitlich gut mit der Myelinisierung dieser Hirnregion korreliert. Eine Reihe von *in vivo* und *in vitro* Experimenten verschiedener Arbeitsgruppen demonstrierten, dass Myelin starke auswachsinhibitorische Eigenschaften hat, die sogar den Kollaps von Wachstumskolben induzieren können. In Längenauswachsassays zeigte sich, dass Myelin einen starken inhibitorischen Effekt auf das Längenwachstum von entorhinalen Axonen hat. Mit physikalischen Separationstechniken und unter Verwendung des funktionellen Antikörpers gegen inhibitorische Myelinproteine (IN-1) konnte dieser Effekt neutralisiert werden und das neuronale Längenwachstum war wieder vergleichbar zur Kontrollsituation. Untersuchungen im Streifenassay ergaben zusätzlich, dass das wachstumsinhibitorische Myelin und seine Komponenten keine axonalen Lenkungseigenschaften hatte und die gerichtete Zielfindung axonalen Auswachsens nicht beeinflusst. In weiteren Experimenten wurden die membran-assoziierten Faktoren im deafferenzierten Hippocampus untersucht. Dabei zeigte sich, dass nach einer Läsion wachstumsfördernde Faktoren in hippocampalen Membranen vorliegen. Zusätzlich liegen in einem engen Zeitfenster axonale Lenkungsmoleküle vor mit vergleichbarer Attraktivität für entorhinale Axone, wie sie aus

entsprechenden Entwicklungsstadien bekannt sind. Die Experimente lassen den Schluss zu, dass im deafferenzierten Hippocampus Faktoren läSIONSinduziert werden, und dass diese Faktoren membran-assoziiert sind.

Es wird seit langem angenommen, dass das ZNS von adulten Vertebraten in seinem zellulären Zustand determiniert ist und zu keinen grösseren plastischen Veränderungen fähig ist. Gerade nach einer Schädigung von adultem ZNS ist die Regenerationsfähigkeit im Unterschied zu jungen, postnatalen ZNS sehr eingeschränkt. Die beschränkte Regenerationsfähigkeit des adulten ZNS ist wesentlich determiniert durch die Präsenz des auswachs-inhibitorischen Myelins. Nichtsdestotrotz gibt es kompensatorisches Sprouting im Hippocampus, die verlorengegangene synaptische Kontakte ersetzen. Die Identifizierung der Faktoren, die das schichten-spezifische Einwachsen aussprossender Axone kontrollieren, trägt wesentlich zum Verständnis dieses Phänomens bei. Weiterhin wird die Aufklärung der zugrundeliegenden molekularen Faktoren für die spezifische Zielerkennung und deren Charakterisierung uns helfen, das Potential und die Limitation der Regeneration im ZNS besser zu verstehen und die Möglichkeit eröffnen, einmal verlorengegangene neuronale Verbindungen durch therapeutische Intervention wieder spezifisch aufzubauen.

Schlagwörter: Hippocampus, Streifenassay, IgCAM, Wegfindungsmoleküle, Axon guidance, Regeneration, Myelin, Sprouting.

7. SUMMARY

In this study, the impact of membrane-associated factors on axonal outgrowth during development and following lesion was examined. We studied the maturation-dependent features of membrane-associated molecules in the hippocampus with the stripe assay for guidance activity and with the outgrowth assay for outgrowth-supporting activity.

We could show that entorhinal axons discriminate between their proper target area, the hippocampus, and control regions which do not receive synaptic connections from the entorhinal cortex, and preferred to grow on hippocampal membranes. Further, we examined guidance preferences of entorhinal neurites on hippocampal membranes in different developmental stages. The choice behavior of entorhinal neurites for hippocampal membranes temporally correlates with the ingrowth of the perforant path into the hippocampus and with the stabilization of this brain area *in vivo*, and further indicate the transient presence of membrane-associated guidance cues in the hippocampus.

One of the characteristics of maturational processes in the central nervous system is the developmentally regulated myelination of fiber tracts. Comparison of the stripe assay data with immunohistochemical analysis for MBP and MAG as representative myelin markers revealed a correlation between the changes in axonal choice behavior and increasing myelination. It is known that myelin itself is a strong axonal outgrowth inhibitor and that myelin can also induce growth cone collapse. In outgrowth assays, we could show that myelin has a strong outgrowth inhibitory influence on entorhinal axons which can be neutralized by the monoclonal antibody IN-1. However, in the stripe assay, myelin did not influence the choice behavior of outgrowing axons and this indicates that myelin does not govern information for directed growth. Furthermore, stripe assays were performed with membranes obtained from deafferented hippocampi at various lesion stages. In these experiments, we could show that outgrowth-promoting factors are present in the lesioned hippocampus. Moreover, data from the stripe assay revealed the timely restricted presence of membrane-bound guidance factors which are equally as attractive as neonatal hippocampal membranes. These experiments indicate the lesion-induced expression of outgrowth-promoting factors in the hippocampus, which correlates temporally with the sprouting reaction *in vivo*.

It is suggested that the central nervous system of adult vertebrates is determined in its cellular condition and not capable of structural changes. This is most evident following lesion of adult brain, where the ability for regeneration is highly restricted in comparison to young, postnatal neural tissue. This restricted ability for regeneration in the adult brain is essentially determined by the presence of outgrowth-inhibitory myelin. However, a compensatory

sprouting response exists in the adult hippocampus following lesion, which leads to a layer-specific replacement of lost synaptic contacts. The identification of these factors will lead to a deeper understanding of layer-specific axonal sprouting and synaptic replacement. Further, the identification and characterization of the underlying factors will help us to understand the potential and limitations of regeneration in the central nervous system.

Keywords: axon guidance molecule, regeneration, hippocampus, sprouting, IgCAM, collapse, attraction, myelin, outgrowth-promoting molecules.

LITERATURVERZEICHNIS

Amaral,D.G. and Witter,M.P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31, 571-591.

Arendt T. Alzheimer's disease as a disorder of mechanisms underlying structural brain self-organization. *Neuroscience*. 2001; 102:723-765.

Aubert,I., Ridet,J.L., and Gage,F.H. (1995). Regeneration in the adult mammalian CNS: guided by development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5, 625-635.

Bahr,M. and Wizenmann,A. (1996). Retinal ganglion cell axons recognize specific guidance cues present in the deafferented adult rat superior colliculus. *J. Neurosci.* 16, 5106-5116.

Banati,R.B., Gehrman,J., and Kreutzberg,G.W. (1994). Glial beta-amyloid precursor protein: expression in the dentate gyrus after entorhinal cortex lesion. *Neuroreport* 5, 1359-1361.

Bandtlow,C.E. and Schwab,M.E. (2000). NI-35/250/nogo-a: a neurite growth inhibitor restricting structural plasticity and regeneration of nerve fibers in the adult vertebrate CNS. *Glia* 29, 175-181.

Bechmann,I. and Nitsch,R. (1997). Astrocytes and microglial cells incorporate degenerating fibers following entorhinal lesion: a light, confocal, and electron microscopical study using a phagocytosis-dependent labeling technique. *Glia* 20, 145-154.

Bechmann I, Peter S, Beyer M, Gimsa U, Nitsch R. Presence of B7--2 (CD86) and lack of B7--1 (CD80) on myelin phagocytosing MHC-II-positive rat microglia is associated with nondestructive immunity in vivo. *FASEB J.* 2001 Apr;15(6):1086-8.

Beilharz,E.J., Zhukovsky,E., Lanahan,A.A., Worley,P.F., Nikolich,K., and Goodman,L.J. (1998). Neuronal activity induction of the stathmin-like gene RB3 in the rat hippocampus: possible role in neuronal plasticity. *J. Neurosci.* 18, 9780-9789.

Benowitz,L.I., Rodriguez,W.R., and Neve,R.L. (1990). The pattern of GAP-43 immunostaining changes in the rat hippocampal formation during reactive synaptogenesis. *Brain Res. Mol Brain Res.* 8, 17-23.

Bonhoeffer,F. and Huf,J. (1985). Position-dependent properties of retinal axons and their growth cones. *Nature* 315, 409-410.

Borrell V, Del Rio JA, Alcantara S, Derer M, Martinez A, D'Arcangelo G, Nakajima K, Mikoshiba K, Derer P, Curran T, Soriano E. Reelin regulates the development and synaptogenesis of the layer-specific entorhino-hippocampal connections. *J Neurosci.* 1999; 19:1345-58.

Bovolenta,P., Feraud-Espinosa,I., Mendez-Otero,R., and Nieto,S. (1997). Neurite outgrowth inhibitor of gliotic brain tissue. Mode of action and cellular localization, studied with specific monoclonal antibodies. *Eur. J. Neurosci.* 9, 977-989.

Braak,H. and Braak,E. (1990). Neurofibrillary changes confined to the entorhinal region and an abundance of cortical amyloid in cases of presenile and senile dementia. *Acta Neuropathol. (Berl)* 80, 479-486.

Braak,H. and Braak,E. (1993). Entorhinal-hippocampal interaction in mnestic disorders. *Hippocampus 3 Spec No239-46*, -46.

Brauer,A.U., Savaskan,N.E., Plaschke,M., Prehn,S., Ninnemann,O., and Nitsch,R. (2000). IG-molecule Kilon shows differential expression pattern from LAMP in the developing and adult rat hippocampus. *Hippocampus 10*, 632-644.

Brauer,A.U., Savaskan,N.E., Plaschke,M., Ninnemann,O., and Nitsch,R. (2001). Perforant path lesion induces up-regulation of stathmin messenger RNA, but not SCG10 messenger RNA, in the adult rat hippocampus. *Neuroscience 102*, 515-526.

Breidbach O. (1997). Die Materialisierung des Ichs. Suhrkamp, Frankfurt am Main.

Brummendorf,T. and Rathjen,F.G. (1995). Cell adhesion molecules 1: immunoglobulin superfamily. *Protein Profile. 2*, 963-1108.

Bruses J.L. and Rutishauser U. (2001). Roles, regulation, and mechanism of polysialic acid function during neural development. *Biochimie 83*, 635-643.

Cabalka,L.M., Hyman,B.T., Goodlett,C.R., Ritchie,T.C., and Van Hoesen,G.W. (1992). Alteration in the pattern of nerve terminal protein immunoreactivity in the perforant pathway in Alzheimer's disease and in rats after entorhinal lesions. *Neurobiol. Aging 13*, 283-291.

Caceres,A., Busciglio,J., Ferreira,A., and Steward,O. (1988). An immunocytochemical and biochemical study of the microtubule-associated protein MAP-2 during post-lesion dendritic remodeling in the central nervous system of adult rats. *Brain Res. 427*, 233-246.

Caroni,P. and Schwab,M.E. (1988). Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter. *Neuron 1*, 85-96.

Caroni,P. and Schwab,M.E. (1988). Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory properties for neurite growth and fibroblast spreading. *J. Cell Biol. 106*, 1281-1288.

Castellani,V., Yue,Y., Gao,P.P., Zhou,R., and Bolz,J. (1998). Dual action of a ligand for Eph receptor tyrosine kinases on specific populations of axons during the development of cortical circuits. *J. Neurosci. 18*, 4663-4672.

Ceranik,K., Deng,J., Heimrich,B., Lubke,J., Zhao,S., Forster,E., and Frotscher,M. (1999). Hippocampal Cajal-Retzius cells project to the entorhinal cortex: retrograde tracing and intracellular labelling studies. *Eur. J. Neurosci. 11*, 4278-4290.

Chedotal,A., Del Rio,J.A., Ruiz,M., He,Z., Borrell,V., de Castro,F., Ezan,F., Goodman,C.S., Tessier-Lavigne,M., Sotelo,C., and Soriano,E. (1998). Semaphorins III and IV repel hippocampal axons via two distinct receptors. *Development 125*, 4313-4323.

Chen,M.S., Huber,A.B., van der Haar,M.E., Frank,M., Schnell,L., Spillmann,A.A., Christ,F., and Schwab,M.E. (2000). Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature 403*, 434-439.

Colman,D.R., Kreibich,G., Frey,A.B., and Sabatini,D.D. (1982). Synthesis and incorporation of myelin polypeptides into CNS myelin. *J. Cell Biol. 95*, 598-608.

Conner,J.M., Fass-Holmes,B., and Varon,S. (1994). Changes in nerve growth factor immunoreactivity following entorhinal cortex lesions: possible molecular mechanism regulating cholinergic sprouting. *J. Comp Neurol.* 345, 409-418.

Cotman,C.W., Geddes,J.W., and Kahle,J.S. (1990). Axon sprouting in the rodent and Alzheimer's disease brain: a reactivation of developmental mechanisms? *Prog. Brain Res.* 83427-34, -34.

Cremer,H., Lange,R., Christoph,A., Plomann,M., Vopper,G., Roes,J., Brown,R., Baldwin,S., Kraemer,P., Scheff,S., and et,a. (1994). Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature* 367, 455-459.

Cremer,H., Chazal,G., Goridis,C., and Represa,A. (1997). NCAM is essential for axonal growth and fasciculation in the hippocampus. *Mol. Cell Neurosci.* 8, 323-335.

Dasheiff,R.M. and McNamara,J.O. (1982). Electrolytic entorhinal lesions cause seizures. *Brain Res.* 231, 444-450.

Del Rio,J.A., Heimrich,B., Borrell,V., Forster,E., Drakew,A., Alcantara,S., Nakajima,K., Miyata,T., Ogawa,M., Mikoshiba,K., Derer,P., Frotscher,M., and Soriano,E. (1997). A role for Cajal-Retzius cells and reelin in the development of hippocampal connections. *Nature* 385, 70-74.

Deller,T., Frotscher,M., and Nitsch,R. (1995). Morphological evidence for the sprouting of inhibitory commissural fibers in response to the lesion of the excitatory entorhinal input to the rat dentate gyrus. *J. Neurosci.* 15, 6868-6878.

Deller,T., Nitsch,R., and Frotscher,M. (1996a). Layer-specific sprouting of commissural fibres to the rat fascia dentata after unilateral entorhinal cortex lesion: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin tracing study. *Neuroscience* 71, 651-660.

Deller,T., Martinez,A., Nitsch,R., and Frotscher,M. (1996b). A novel entorhinal projection to the rat dentate gyrus: direct innervation of proximal dendrites and cell bodies of granule cells and GABAergic neurons. *J. Neurosci.* 16, 3322-3333.

Deller,T. and Frotscher,M. (1997). Lesion-induced plasticity of central neurons: sprouting of single fibres in the rat hippocampus after unilateral entorhinal cortex lesion. *Prog. Neurobiol.* 53, 687-727.

Deller,T., Haas,C.A., Naumann,T., Joester,A., Faissner,A., and Frotscher,M. (1997). Up-regulation of astrocyte-derived tenascin-C correlates with neurite outgrowth in the rat dentate gyrus after unilateral entorhinal cortex lesion. *Neuroscience* 81, 829-846.

Deller T, Drakew A, Frotscher M. Different primary target cells are important for fiber lamination in the fascia dentata: a lesson from reeler mutant mice. *Exp Neurol.* 1999; 156:239-53.

Deller,T., Haas,C.A., and Frotscher,M. (2000). Reorganization of the rat fascia dentata after a unilateral entorhinal cortex lesion. Role of the extracellular matrix. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 911207-20, -20.

- Diekmann,S., Ohm,T.G., and Nitsch,R. (1996). Long-lasting transneuronal changes in rat dentate granule cell dendrites after entorhinal cortex lesion. A combined intracellular injection and electron microscopy study. *Brain Pathol.* 6, 205-214.
- Drescher,U., Kremoser,C., Handwerker,C., Loschinger,J., Noda,M., and Bonhoeffer,F. (1995). In vitro guidance of retinal ganglion cell axons by RAGS, a 25 kDa tectal protein related to ligands for Eph receptor tyrosine kinases. *Cell* 82, 359-370.
- Du,F., Eid,T., Lothman,E.W., Kohler,C., and Schwarcz,R. (1995). Preferential neuronal loss in layer III of the medial entorhinal cortex in rat models of temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci.* 15, 6301-6313.
- Eagle,K.S., Chalmers,G.R., Clary,D.O., and Gage,F.H. (1995). Axonal regeneration and limited functional recovery following hippocampal deafferentation. *J. Comp Neurol.* 363, 377-388.
- Emerling,D.E. and Lander,A.D. (1996). Inhibitors and promoters of thalamic neuron adhesion and outgrowth in embryonic neocortex: functional association with chondroitin sulfate. *Neuron* 17, 1089-1100.
- Fagan,A.M. and Gage,F.H. (1990). Cholinergic sprouting in the hippocampus: a proposed role for IL-1. *Exp. Neurol.* 110, 105-120.
- Fagan,A.M., Suhr,S.T., Lucidi-Phillipi,C.A., Peterson,D.A., Holtzman,D.M., and Gage,F.H. (1997). Endogenous FGF-2 is important for cholinergic sprouting in the denervated hippocampus. *J. Neurosci.* 17, 2499-2511.
- Forster E.,Zhao S, Frotscher M. (2001). Hyaluronan-associated adhesive cues control fiber segregation in the hippocampus. *Development.* 128, 3029-3039.
- Forster,E., Kaltschmidt,C., Deng,J., Cremer,H., Deller,T., and Frotscher,M. (1998). Lamina-specific cell adhesion on living slices of hippocampus. *Development* 125, 3399-3410.
- Fournier,A.E., GrandPre,T., and Strittmatter,S.M. (2001). Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature* 409, 341-346.
- Frotscher,M. and Heimrich,B. (1993). Formation of layer-specific fiber projections to the hippocampus in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 10400-10403.
- Frotscher,M., Heimrich,B., Deller,T., and Nitsch,R. (1995). Understanding the cortex through the hippocampus: lamina-specific connections of the rat hippocampal neurons. *J. Anat.* 187, -45.
- Frotscher,M., Heimrich,B., and Deller,T. (1997). Sprouting in the hippocampus is layer-specific. *Trends Neurosci.* 20, 218-223.
- Frotscher, M., Seress, L., and Heimrich, B. (2001). Early generated Cajal-Retzius cells have different functions in cortical development. Chapter 4 from *Brain Stem Cells*, Oxford, Scientific Publishers, 1th edition.
- Galko,M.J. and Tessier-Lavigne,M. (2000). Biochemical characterization of netrin-synergizing activity. *J. Biol. Chem.* 275, 7832-7838.

- Gall,C., Rose,G., and Lynch,G. (1979). Proliferative and migratory activity of glial cells in the partially deafferented hippocampus. *J. Comp Neurol.* 183, 539-549.
- Gao,P.P., Zhang,J.H., Yokoyama,M., Racey,B., Dreyfus,C.F., Black,I.B., and Zhou,R. (1996). Regulation of topographic projection in the brain: Elf-1 in the hippocamposeptal system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 11161-11166.
- Gazzaley,A.H., Benson,D.L., Huntley,G.W., and Morrison,J.H. (1997). Differential subcellular regulation of NMDAR1 protein and mRNA in dendrites of dentate gyrus granule cells after perforant path transection. *J. Neurosci.* 17, 2006-2017.
- Geddes JW, Anderson KJ, Cotman CW. Senile plaques as aberrant sprout-stimulating structures. *Exp Neurol.* 198;94(3):767-76.
- Geddes,J.W., Hess,E.J., Hart,R.A., Kesslak,J.P., Cotman,C.W., and Wilson,M.C. (1990). Lesions of hippocampal circuitry define synaptosomal-associated protein-25 (SNAP-25) as a novel presynaptic marker. *Neuroscience* 38, 515-525.
- Gehrmann,J., Schoen,S.W., and Kreutzberg,G.W. (1991). Lesion of the rat entorhinal cortex leads to a rapid microglial reaction in the dentate gyrus. A light and electron microscopical study. *Acta Neuropathol. (Berl)* 82, 442-455.
- Giannelli,G., Falk-Marzillier,J., Schiraldi,O., Stetler-Stevenson,W.G., and Quaranta,V. (1997). Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5. *Science* 277, 225-228.
- Gomez-Pinilla,F., Lee,J.W., and Cotman,C.W. (1992). Basic FGF in adult rat brain: cellular distribution and response to entorhinal lesion and fimbria-fornix transection. *J. Neurosci.* 12, 345-355.
- Goodman,C.S. (1996). Mechanisms and molecules that control growth cone guidance. *Annu. Rev. Neurosci.* 19341-77, -77.
- Guthrie,K.M., Woods,A.G., Nguyen,T., and Gall,C.M. (1997). Astroglial ciliary neurotrophic factor mRNA expression is increased in fields of axonal sprouting in deafferented hippocampus. *J. Comp Neurol.* 386, 137-148.
- Haas,C.A., Deller,T., and Frotscher,M. (1997). Basal expression, subcellular distribution, and up-regulation of the proto-oncogene c-JUN in the rat dentate gyrus after unilateral entorhinal cortex lesion. *Neuroscience* 81, 33-45.
- Haas,C.A., Rauch,U., Thon,N., Merten,T., and Deller,T. (1999). Entorhinal cortex lesion in adult rats induces the expression of the neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan in reactive astrocytes. *J. Neurosci.* 19, 9953-9963.
- Hailer NP, Bechmann I, Heizmann S, and Nitsch R. Adhesion molecule expression on phagocytic microglial cells following anterograde degeneration of perforant path axons. *Hippocampus.* 1997;7(3):341-9.

- Hardman,R., Evans,D.J., Fellows,L., Hayes,B., Rupniak,H.T., Barnes,J.-C., and Higgins,G.A. (1997). Evidence for recovery of spatial learning following entorhinal cortex lesions in mice. *Brain Res.* 758, 187-200.
- Hattori,M., Osterfield,M., and Flanagan,J.G. (2000). Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent. *Science* 289, 1360-1365.
- Hirsch,S. and Bahr,M. (1999). Growth promoting and inhibitory effects of glial cells in the mammalian nervous system. *Adv. Exp. Med. Biol.* 468/199-205, -205.
- Huber,A.B. and Schwab,M.E. (2000). Nogo-A, a potent inhibitor of neurite outgrowth and regeneration. *Biol. Chem.* 381, 407-419.
- Hyman,B.T., Van Horsen,G.W., Damasio,A.R., and Barnes,C.L. (1984). Alzheimer's disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science* 225, 1168-1170.
- Inoue,A. and Sanes,J.R. (1997). Lamina-specific connectivity in the brain: regulation by N-cadherin, neurotrophins, and glycoconjugates. *Science* 276, 1428-1431.
- Isacson,O. and Deacon,T.W. (1996). Specific axon guidance factors persist in the adult brain as demonstrated by pig neuroblasts transplanted to the rat. *Neuroscience* 75, 827-837.
- Jensen,M.B., Gonzalez,B., Castellano,B., and Zimmer,J. (1994). Microglial and astroglial reactions to anterograde axonal degeneration: a histochemical and immunocytochemical study of the adult rat fascia dentata after entorhinal perforant path lesions. *Exp. Brain Res.* 98, 245-260.
- Jensen MB, Finsen B, Zimmer J. Morphological and immunophenotypic microglial changes in the denervated fascia dentata of adult rats: correlation with blood-brain barrier damage and astroglial reactions. *Exp Neurol.* 1997;143(1):103-16.
- Jucker,M., Mondadori,C., Mohajeri,H., Bartsch,U., and Schachner,M. (1995). Transient upregulation of NCAM mRNA in astrocytes in response to entorhinal cortex lesions and ischemia. *Brain Res. Mol Brain Res.* 28, 149-156.
- Kahle,J.S., Ulas,J., and Cotman,C.W. (1993). Increased sensitivity to adenosine in the rat dentate gyrus molecular layer two weeks after partial entorhinal lesions. *Brain Res.* 609, 201-210.
- Kawaja,M.D. and Gage,F.H. (1991). Reactive astrocytes are substrates for the growth of adult CNS axons in the presence of elevated levels of nerve growth factor. *Neuron* 7, 1019-1030.
- Kelley,M.S. and Steward,O. (1996). The role of postlesion seizures and spreading depression in the upregulation of glial fibrillary acidic protein mRNA after entorhinal cortex lesions. *Exp. Neurol.* 139, 83-94.
- Kelley,M.S. and Steward,O. (1997). Injury-induced physiological events that may modulate gene expression in neurons and glia. *Rev. Neurosci.* 8, 147-177.
- Kirkby,D.L. and Higgins,G.A. (1998). Characterization of perforant path lesions in rodent models of memory and attention. *Eur. J. Neurosci.* 10, 823-838.

- Koshikawa,N., Giannelli,G., Cirulli,V., Miyazaki,K., and Quaranta,V. (2000). Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5. *J. Cell Biol.* 148, 615-624.
- Krohn,K., Laping,N.J., Morgan,T.E., and Finch,C.E. (1995). Expression of vimentin increases in the hippocampus and cerebral cortex after entorhinal cortex lesioning and in response to transforming growth factor beta 1. *J. Neuroimmunol.* 56, 53-63.
- Kugler,P., Weeger,T., and Horvath,E. (1995). Glutamate dehydrogenase in astrocytes of the rat dentate gyrus following lesion of the entorhinal cortex. *Neuroscience* 64, 173-182.
- Lampert-Etchells M, McNeill TH, Laping NJ, Zarow C, Finch CE, May PC. Sulfated glycoprotein-2 is increased in rat hippocampus following entorhinal cortex lesioning. *Brain Res.* 1991 Nov 1;563(1-2):101-6.
- Lee,K.S., Stanford,E.J., Cotman,C.W., and Lynch,G.S. (1977). Ultrastructural evidence for bouton proliferation in the partially deafferented dentate gyrus of the adult rat. *Exp. Brain Res.* 29, 475-485.
- Li,D., Field,P.M., Starega,U., Li,Y., and Raisman,G. (1993). Entorhinal axons project to dentate gyrus in organotypic slice co-culture. *Neuroscience* 52, 799-813.
- Li,D., Field,P.M., Yoshioka,N., and Raisman,G. (1994). Axons regenerate with correct specificity in horizontal slice culture of the postnatal rat entorhino-hippocampal system. *Eur. J. Neurosci.* 6, 1026-1037.
- Linke,R., Heimrich,B., and Frotscher,M. (1995). Axonal regeneration of identified septohippocampal projection neurons in vitro. *Neuroscience* 68, 1-4.
- Lozano,A.M., Labes,M., Roder,J., and Roach,A. (1995). An antineuronal monoclonal antibody that reverses neurite growth inhibition by central nervous system myelin. *J. Neurosci. Res.* 42, 306-313.
- Lynch,G., Deadwyler,S., and Cotman,G. (1973). Postlesion axonal growth produces permanent functional connections. *Science* 180, 1364-1366.
- May PC, Lampert-Etchells M, Johnson SA, Poirier J, Masters JN, Finch CE. Dynamics of gene expression for a hippocampal glycoprotein elevated in Alzheimer's disease and in response to experimental lesions in rat. *Neuron.* 1990 Dec;5(6):831-9.
- Matthews,D.A., Cotman,C., and Lynch,G. (1976). An electron microscopic study of lesion-induced synaptogenesis in the dentate gyrus of the adult rat. II. Reappearance of morphologically normal synaptic contacts. *Brain Res.* 115, 23-41.
- Matthews,D.A., Cotman,C., and Lynch,G. (1976). An electron microscopic study of lesion-induced synaptogenesis in the dentate gyrus of the adult rat. I. Magnitude and time course of degeneration. *Brain Res.* 115, 1-21.

- McKay,R.D. (1989). The origins of cellular diversity in the mammalian central nervous system. *Cell* 58, 815-821.
- McKeon,R.J., Schreiber,R.C., Rudge,J.S., and Silver,J. (1991). Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *J. Neurosci.* 11, 3398-3411.
- McKerracher,L., David,S., Jackson,D.L., Kottis,V., Dunn,R.J., and Braun,P.E. (1994). Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. *Neuron* 13, 805-811.
- Mesulam,M.M., Geula,C., and Moran,M.A. (1987). Anatomy of cholinesterase inhibition in Alzheimer's disease: effect of physostigmine and tetrahydroaminoacridine on plaques and tangles. *Ann. Neurol.* 22, 683-691.
- Miller,F.D. and Geddes,J.W. (1990). Increased expression of the major embryonic alpha-tubulin mRNA, T alpha 1, during neuronal regeneration, sprouting, and in Alzheimer's disease. *Prog. Brain Res.* 86321-30, -30.
- Miller,P.D., Styren,S.D., Lagenaur,C.F., and DeKosky,S.T. (1994). Embryonic neural cell adhesion molecule (N-CAM) is elevated in the denervated rat dentate gyrus. *J. Neurosci.* 14, 4217-4225.
- Mizukami,K., Ikonovic,M.D., Mishizin,A., Sheffield,R., Grayson,D.R., and Armstrong,D.M. (1997). Alterations of GABA(A)beta2/3 immunoreactivity in the dentate gyrus after perforant pathway lesion. *Neuroreport* 8, 3379-3383.
- Morgan,T.E., Nichols,N.R., Pasinetti,G.M., and Finch,C.E. (1993). TGF-beta 1 mRNA increases in macrophage/microglial cells of the hippocampus in response to deafferentation and kainic acid-induced neurodegeneration. *Exp. Neurol.* 120, 291-301.
- Mueller,B.K. (1999). Growth cone guidance: first steps towards a deeper understanding. *Annu. Rev. Neurosci.* 22351-88, -88.
- Mukhopadhyay,G., Doherty,P., Walsh,F.S., Crocker,P.R., and Filbin,M.T. (1994). A novel role for myelin-associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration. *Neuron* 13, 757-767.
- Mullis,K., Faloona,F., Scharf,S., Saiki,R., Horn,G., and Erlich,H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51 Pt 1263-73, -73.
- Myhrer,T. (1975). Maze performance in rats with hippocampal perforant paths lesions: some aspects of functional recovery. *Physiol Behav.* 15, 433-437.
- Nadler,J.V., Cotman,C.W., Paoletti,C., and Lynch,G.S. (1977). Histochemical evidence of altered development of cholinergic fibers in the rat dentate gyrus following lesions. II. Effects of partial entorhinal and simultaneous multiple lesions. *J. Comp Neurol.* 171, 589-604.
- Nedivi,E. (1999). Molecular analysis of developmental plasticity in neocortex. *J. Neurobiol.* 41, 135-147.

Nguyen-Ba-Charvet,K.T., Brose,K., Marillat,V., Kidd,T., Goodman,C., Tessier-Lavigne,M., Sotelo,C., and Chedotal,A. (1999). Slit2-Mediated chemorepulsion and collapse of developing forebrain axons. *Neuron* 22, 463-473.

Nieto-Sampedro,M., Hoff,S.F., and Cotman,C.W. (1982). Perforated postsynaptic densities: probable intermediates in synapse turnover. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 79, 5718-5722.

Nieto-Sampedro,M. (1999). Neurite outgrowth inhibitors in gliotic tissue. *Adv. Exp. Med. Biol.* 468207-24, -24.

Nitsch,R. and Frotscher,M. (1992). Reduction of posttraumatic transneuronal "early gene" activation and dendritic atrophy by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 5197-5200.

Nitsch,R. (1993). Transneuronal changes in the lesioned entorhinal-hippocampal system. *Hippocampus* 3 *Spec No*247-56, -56.

Nitsch,R. and Frotscher,M. (1993). Transneuronal changes in dendrites of GABAergic parvalbumin-containing neurons of the rat fascia dentata following entorhinal lesion. *Hippocampus* 3, 481-490.

Nomura T, Yabe T, Rosenthal ES, Krzan M, Schwartz JP. PSA-NCAM distinguishes reactive astrocytes in 6-OHDA-lesioned substantia nigra from those in the striatal terminal fields. *J Neurosci Res.* 2000; 61:588-596.

Norton,W.T., Aquino,D.A., Hozumi,I., Chiu,F.C., and Brosnan,C.F. (1992). Quantitative aspects of reactive gliosis: a review. *Neurochem. Res.* 17, 877-885.

Nusslein-Volhard,C. and Wieschaus,E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795-801.

Ono,K., Tomasiewicz,H., Magnuson,T., and Rutishauser,U. (1994). N-CAM mutation inhibits tangential neuronal migration and is phenocopied by enzymatic removal of polysialic acid. *Neuron* 13, 595-609.

Parnavelas,J.G., Lynch,G., Brecha,N., Cotman,C.W., and Globus,A. (1974). Spine loss and regrowth in hippocampus following deafferentation. *Nature* 248, 71-73.

Paxinos G, Watson C, Pennisi M, Topple A. Bregma, lambda and the interaural midpoint in stereotaxic surgery with rats of different sex, strain and weight. *J Neurosci Methods.* 1985; 13:139-43.

Petanceska,S., Canoll,P., and Devi,L.A. (1996). Expression of rat cathepsin S in phagocytic cells. *J. Biol Chem.* 271, 4403-4409.

Phillips,L.L. and Belardo,E.T. (1994). Increase of c-fos and ras oncoproteins in the denervated neuropil of the rat dentate gyrus. *Neuroscience* 58, 503-514.

Phinney AL, Deller T, Stalder M, Calhoun ME, Frotscher M, Sommer B, Staufenbiel M, Jucker M. Cerebral amyloid induces aberrant axonal sprouting and ectopic terminal formation in amyloid precursor protein transgenic mice. *J Neurosci.* 1999, 19(19):8552-9.

Pimenta,A.F., Zhukareva,V., Barbe,M.F., Reinoso,B.S., Grimley,C., Henzel,W., Fischer,I., and Levitt,P. (1995). The limbic system-associated membrane protein is an Ig superfamily member that mediates selective neuronal growth and axon targeting. *Neuron* 15, 287-297.

Poirier J, Dea D, Baccichet A, and Gauthier S. Modulation of gamma-actin and alpha 1-tubulin expression by corticosterone during neuronal plasticity in the hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res.* 1992;15(3-4):263-8.

Pozas E, Pascual M, Nguyen Ba-Charvet KT, Guijarro P, Sotelo C, Chedotal A, Del Rio JA, and Soriano E. Age-dependent effects of secreted Semaphorins 3A, 3F, and 3E on developing hippocampal axons: in vitro effects and phenotype of Semaphorin 3A (-/-) mice. *Mol Cell Neurosci.* 2001 Jul;18(1):26-43.

Price,D.L., Sisodia,S.S., and Borchelt,D.R. (1998). Alzheimer disease--when and why? *Nat. Genet.* 19, 314-316.

Puschel,A.W. (1996). The semaphorins: a family of axonal guidance molecules? *Eur. J. Neurosci.* 8, 1317-1321.

Raineteau,O. and Schwab,M.E. (2001). Plasticity of motor systems after incomplete spinal cord injury. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 263-273.

Raisman G. Neuronal plasticity in the septal nuclei of the adult rat. *Brain Res.* 1969; 14(1):25-48.

Rakic,P. (1971). Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in Macacus Rhesus. *J. Comp Neurol.* 141, 283-312.

Ramon y Cajal S. (1911). *Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme etdes Vertébrés.*, Maloine, ed. (Paris.

Ramon y Cajal S. (1929). *Degeneration and Regeneration of the nervous system.* (New York: Hafner).

Rathjen,F.G. and Schachner,M. (1984). Immunocytological and biochemical characterization of a new neuronal cell surface component (L1 antigen) which is involved in cell adhesion. *EMBO J.* 3, 1-10.

Retzius G. (1893). Die Cajalschen Zellen der Grosshirnrinde beim Menschen und bei Säugetieren. *Biol. Unters.* 5, 1-9.

Rose,G., Lynch,G., and Cotman,C.W. (1976). Hypertrophy and redistribution of astrocytes in the deafferented dentate gyrus. *Brain Res. Bull.* 1, 87-92.

Rudge,J.S. and Silver,J. (1990). Inhibition of neurite outgrowth on astroglial scars in vitro. *J. Neurosci.* 10, 3594-3603.

Sakmann,B. and Neher,E. (1984). Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Annu. Rev. Physiol* 46:55-72, -72.

Savaskan,N.E., Eyupoglu,I.Y., Brauer,A.U., Plaschke,M., Ninnemann,O., Nitsch,R., and Skutella,T. (2000). Entorhinal cortex lesion studied with the novel dye fluoro-jade. *Brain Res.* 864, 44-51.

Savaskan N.E, Bräuer A.U.; Plaschke M., Ninnemann O., Land D.M., and Nitsch R.: ESA is upregulated in reactive astrocytes following lesion in the hippocampus. Society for Neuroscience (New Orleans, USA) 2000.

Savio,T. and Schwab,M.E. (1989). Rat CNS white matter, but not gray matter, is nonpermissive for neuronal cell adhesion and fiber outgrowth. *J. Neurosci.* 9, 1126-1133.

Scheff,S.W. and Cotman,C.W. (1977). Recovery of spontaneous alternation following lesions of the entorhinal cortex in adult rats: possible correlation to axon sprouting. *Behav. Biol.* 21, 286-293.

Schoen,S.W. and Kreutzberg,G.W. (1994). Synaptic 5'-nucleotidase activity reflects lesion-induced sprouting within the adult rat dentate gyrus. *Exp. Neurol.* 127, 106-118.

Schroder,W., Hager,G., Kouprijanova,E., Weber,M., Schmitt,A.B., Seifert,G., and Steinhauser,C. (1999). Lesion-induced changes of electrophysiological properties in astrocytes of the rat dentate gyrus. *Glia* 28, 166-174.

Schulte,T., Paschke,K.A., Laessing,U., Lottspeich,F., and Stuermer,C. (1997). Reggie-1 and reggie-2, two cell surface proteins expressed by retinal ganglion cells during axon regeneration. *Development* 124 , 577-587.

Schwab,M.E., Kapfhammer,J.P., and Bandtlow,C.E. (1993). Inhibitors of neurite growth. *Annu. Rev. Neurosci.* 16:65-95, -95.

Simpson IA, Sonne O. A simple, rapid, and sensitive method for measuring protein concentration in subcellular membrane fractions prepared by sucrose density ultracentrifugation. *Anal Biochem.* 1982; 119: 424-427.

Skutella,T., Savaskan,N.E., Ninnemann,O., and Nitsch,R. (1999). Target- and maturation-specific membrane-associated molecules determine the ingrowth of entorhinal fibers into the hippocampus. *Dev. Biol.* 211, 277-292.

Skutella,T. and Nitsch,R. (2001). New molecules for hippocampal development. *Trends Neurosci.* 24, 107-113.

Smith,R. (1992). The basic protein of CNS myelin: its structure and ligand binding. *J. Neurochem.* 59, 1589-1608.

Snyder,D.C., Coltman,B.W., Muneoka,K., and Ide,C.F. (1991). Mapping the early development of projections from the entorhinal cortex in the embryonic mouse using prenatal surgery techniques. *J. Neurobiol.* 22, 897-906.

Soriano,E., Del Rio,J.A., Martinez,A., and Super,H. (1994). Organization of the embryonic and early postnatal murine hippocampus. I. Immunocytochemical characterization of neuronal populations in the subplate and marginal zone. *J. Comp Neurol.* 342, 571-595.

Southern,E. (1979). Gel electrophoresis of restriction fragments. *Methods Enzymol.* 68:52-76, -76.

- Stein,E., Savaskan,N.E., Ninnemann,O., Nitsch,R., Zhou,R., and Skutella,T. (1999). A role for the Eph ligand ephrin-A3 in entorhino-hippocampal axon targeting. *J. Neurosci.* *19*, 8885-8893.
- Steup,A., Lohrum,M., Hamscho,N., Savaskan,N.E., Ninnemann,O., Nitsch,R., Fujisawa,H., Puschel,A.W., and Skutella,T. (2000). Sema3C and netrin-1 differentially affect axon growth in the hippocampal formation. *Mol. Cell Neurosci.* *15*, 141-155.
- Steward,O. and Scoville,S.A. (1976). Cells of origin of entorhinal cortical afferents to the hippocampus and fascia dentata of the rat. *J. Comp Neurol.* *169*, 347-370.
- Steward,O. (1976). Reinnervation of dentate gyrus by homologous afferents following entorhinal cortical lesions in adult rats. *Science* *194*, 426-428.
- Steward,O. and Loesche,J. (1977). Quantitative autoradiographic analysis of the time course of proliferation of contralateral entorhinal efferents in the dentate gyrus denervated by ipsilateral entorhinal lesions. *Brain Res.* *125*, 11-21.
- Steward,O., Vinsant,S.L., and Davis,L. (1988). The process of reinnervation in the dentate gyrus of adult rats: an ultrastructural study of changes in presynaptic terminals as a result of sprouting. *J. Comp Neurol.* *267*, 203-210.
- Steward,O. (1989). Reorganization of neuronal connections following CNS trauma: principles and experimental paradigms. *J. Neurotrauma* *6*, 99-152.
- Steward,O., Kelley,M.S., and Torre,E.R. (1993). The process of reinnervation in the dentate gyrus of adult rats: temporal relationship between changes in the levels of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and GFAP mRNA in reactive astrocytes. *Exp. Neurol.* *124*, 167-183.
- Steward,O. (1995). The process of reinnervation in the dentate gyrus of adult rats: gene expression by neurons during the period of lesion-induced growth. *J. Comp Neurol.* *359*, 391-411.
- Steward,O. (1995). The process of reinnervation in the dentate gyrus of adult rats: gene expression by neurons during the period of lesion-induced growth. *J. Comp Neurol.* *359*, 391-411.
- Steward,O., Wallace,C.S., Lyford,G.L., and Worley,P.F. (1998). Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. *Neuron* *21*, 741-751.
- Styren,S.D., Miller,P.D., Lagenaur,C.F., and DeKosky,S.T. (1995). Alternate strategies in lesion-induced reactive synaptogenesis: differential expression of L1 in two populations of sprouting axons. *Exp. Neurol.* *131*, 165-173.
- Super,H. and Soriano,E. (1994). The organization of the embryonic and early postnatal murine hippocampus. II. Development of entorhinal, commissural, and septal connections studied with the lipophilic tracer DiI. *J. Comp Neurol.* *344*, 101-120.
- Tang,J., Rutishauser,U., and Landmesser,L. (1994). Polysialic acid regulates growth cone behavior during sorting of motor axons in the plexus region. *Neuron* *13*, 405-414.

- Tello F. (1911). La influencia del neurotropismo en la regeneracion de los centros nerviosos. *Trab Lab Invest Biol* 9, 123-1591.
- Tessier-Lavigne,M. and Goodman,C.S. (1996). The molecular biology of axon guidance. *Science* 274, 1123-1133.
- Thon,N., Haas,C.A., Rauch,U., Merten,T., Fassler,R., Frotscher,M., and Deller,T. (2000). The chondroitin sulphate proteoglycan brevican is upregulated by astrocytes after entorhinal cortex lesions in adult rats. *Eur. J. Neurosci.* 12, 2547-2558.
- Tomac,A., Lindqvist,E., Lin,L.F., Ogren,S.O., Young,D., Hoffer,B., and Olson,L. (1995). Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo. *Nature* 373, 335-339.
- Tomasiewicz,H., Ono,K., Yee,D., Thompson,C., Goridis,C., Rutishauser,U., and Magnuson,T. (1993). Genetic deletion of a neural cell adhesion molecule variant (N-CAM-180) produces distinct defects in the central nervous system. *Neuron* 11, 1163-1174.
- Treubert,U. and Brummendorf,T. (1998). Functional cooperation of beta1-integrins and members of the Ig superfamily in neurite outgrowth induction. *J. Neurosci.* 18, 1795-1805.
- Van Hoesen,G.W., Hyman,B.T., and Damasio,A.R. (1991). Entorhinal cortex pathology in Alzheimer's disease. *Hippocampus* 1, 1-8.
- Walsh,F.S. and Doherty,P. (1997). Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: role in axon growth and guidance. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 425-56, -56.
- Walter,J., Kern-Veits,B., Huf,J., Stolze,B., and Bonhoeffer,F. (1987). Recognition of position-specific properties of tectal cell membranes by retinal axons in vitro. *Development* 101, 685-696.
- Woodhams,P.L., Atkinson,D.J., and Raisman,G. (1993). Rapid decline in the ability of entorhinal axons to innervate the dentate gyrus with increasing time in organotypic co-culture. *Eur. J. Neurosci.* 5, 1596-1609.
- Woods,A.G., Guthrie,K.M., Kurlawalla,M.A., and Gall,C.M. (1998). Deafferentation-induced increases in hippocampal insulin-like growth factor-1 messenger RNA expression are severely attenuated in middle aged and aged rats. *Neuroscience* 83, 663-668.
- Woolf CJ, Shortland P, Coggeshall RE. Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature.* 1992; 355:75-8.
- Zarow,C. and Finch,C.E. (1995). Limited responses of neuronal mRNAs to unilateral lesions of the rat entorhinal cortex. *Neurosci. Lett.* 185, 87-90.
- Zhou,C.F., Li,Y., and Raisman,G. (1989). Embryonic entorhinal transplants project selectively to the deafferented entorhinal zone of adult mouse hippocampi, as demonstrated by the use of Thy-1 allelic immunohistochemistry. Effect of timing of transplantation in relation to deafferentation. *Neuroscience* 32, 349-362.
- Zhou,R. (1998). The Eph family receptors and ligands. *Pharmacol. Ther.* 77, 151-181.

Zhukareva,V. and Levitt,P. (1995). The limbic system-associated membrane protein (LAMP) selectively mediates interactions with specific central neuron populations. *Development* 121, 1161-1172.

Zimmer,J. and Hjorth-Simonsen,A. (1975). Crossed pathways from the entorhinal area to the fascia dentata. II. Provokable in rats. *J. Comp Neurol.* 161, 71-101.

8. DANKSAGUNG

Zu besonderen Dank bin ich Herrn Prof. Dr. Robert Nitsch verpflichtet. Durch die Freiheit, die er mir gab, konnte ich mich entfalten und die vielen Fazetten wissenschaftlichen Arbeitens entdecken. Seine Kritik und Förderung waren entscheidende Elemente, die mich zum eigenverantwortlichen Wissenschaftler entwickeln ließen. Herrn Dr. Olaf Ninnemann danke ich für die gute Zusammenarbeit und seine exzellenten Korrekturen. Frau Anja Bräuer danke ich für die vielen Hilfen und Ihrer Expertise in den molekularbiologischen Techniken und ihrer systematischen Versuchsplanung. Ich hoffe, daß wir in diesem Quartett unsere laufenden Projekte weiterhin gemeinsam verfolgen und die funktionelle Charakterisierung unserer Klone erfolgreich erarbeiten und zum Abschluss bringen werden. Es steht fest, die Tage des Geheimnis der Schichtenspezifität sind gezählt.

Ich möchte Herrn PD Dr. Thomas Skutella danken für die Betreuung in der ersten Zeit meiner Laborarbeit. Sein Einsatz im Etablieren von Assays ist bemerkenswert. Frau Dr. Martina Plaschke danke ich für Ihren Einsatz in unseren Projekten und hoffe, auch weiterhin auf Sie zählen zu können. Herrn PD Dr. Bernd Heimrich danke ich für die kritischen Beiträge und Kommentare. Seine Präsenz ist ein grosser Gewinn für unserer Abteilung.

Herrn Ilker Eyüpoglu danke ich für seine Zusammenarbeit und immerwährende Hilfsbereitschaft. Seine großen Informatikkenntnisse haben uns schon so manches mal vor der nahenden Deadline gerettet. Ich wünsche mir in der Zukunft weiterhin eine fruchtbare Zusammenarbeit und einen erfolgreichen Abschluss unserer gemeinsamen Projekte.

An dieser Stelle danke ich Frau Brigitte Mannsfeld für Ihre große Graphikexpertise und Ihr unersetzliches Engagement. Sie wird mit Ihrem Fortgang in unserem Institut eine große Lücke hinterlassen. Frau Dore Wachenschwanz und Frau Sabine Lewandowski danke ich für die fototechnische und graphische Expertise und die vielen Hilfen.

Frau Trina Irigo und Frau Marni Pollrich danke ich für ihr Engagement und den zahlreichen kritischen und gewissenhaften Korrekturen.

Herrn Peter Köhler danke ich für die individuellen Lösungen, die manche Experimente erst ermöglichte.

Auch wenn ich sie hier nicht namentlich nenne, danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Ihre Arbeit und Ihren Einsatz.

Für die finanzielle Unterstützung bedanke ich mich bei der Humboldt-Forschungsförderung für die befristeten Stipendien 1998 und 1999, dem DFG Graduiertenkolleg GRK 238 'Schadensmechanismen im ZNS' und der GENNSA Tech Inc (Germany).

VERÖFFENTLICHUNGEN

Savaskan NE & Nitsch R. Molecules involved in reactive sprouting in the hippocampus following perforant path lesion.

Rev Neurosci. 2001, 12: 195-215.

Brauer AU, **Savaskan NE**, et al. Molecular and functional analysis of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the hippocampus after entorhinal cortex lesion.

FASEB J 2001, 18: 2689-2701.

Brauer AU, **Savaskan NE**, Plaschke M, Ninnemann O, Nitsch R.

Perforant path lesion induces upregulation of stathmin mRNA, but not SCG10 mRNA, in the adult rat hippocampus.

Neurosci. 2001, 102 (3): 515-526.

Brauer AU, **Savaskan NE**, Plaschke M, Prehn S, Ninnemann O, Nitsch R.

The Ig-molecule Kilon shows a differential expression pattern to LAMP in the developing and adult hippocampus.

Hippocampus. 2000, 10: 632-644.

Savaskan NE, Eyupoglu IY, Brauer AU, Plaschke M, Ninnemann O, Nitsch R, Skutella T.

Entorhinal cortex lesion studied with the novel dye fluoro-jade.

Brain Res. 2000;864(1):44-51.

Savaskan NE, Skutella T, Brauer AU, Plaschke M, Ninnemann O, Nitsch R.

Outgrowth-promoting molecules in the adult hippocampus after perforant path lesion.

Eur J Neurosci. 2000;12(3):1024-32.

Steup A, Lohrum M, Hamscho N, **Savaskan NE**, Ninnemann O, Nitsch R, Fujisawa H, Puschel AW, Skutella T.

Sema3C and netrin-1 differentially affect axon growth in the hippocampal formation.

Mol Cell Neurosci. 2000;15(2):141-55.

Stein E, **Savaskan NE**, Ninnemann O, Nitsch R, Zhou R, Skutella T.

A role for the Eph ligand ephrin-A3 in entorhino-hippocampal axon targeting.

J Neurosci. 1999;19(20):8885-93.

Skutella T, Savaskan NE*, Ninnemann O, Nitsch R.

Target- and maturation-specific membrane-associated molecules determine the ingrowth of entorhinal fibers into the hippocampus.

Dev Biol. 1999;211(2):277-92.

Steup A, Ninnemann O, Savaskan NE, Nitsch R, Puschel AW, Skutella T.

Semaphorin D acts as a repulsive factor for entorhinal and hippocampal neurons.

Eur J Neurosci. 1999;11(2):729-34.

Savaskan NE, Plaschke M, Ninnemann O, Spillmann AA, Schwab ME, Nitsch R, Skutella T.

Myelin does not influence the choice behaviour of entorhinal axons but strongly inhibits their outgrowth length in vitro.

Eur J Neurosci. 1999;11(1):316-26.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich versichere an Eides Statt, dass ich die vorliegende Dissertation “*Axonale Zielfindung während der Entwicklung und nach Läsion: Analyse membran-assoziiierter Faktoren für die Schichtenspezifität aussprossender Fasern*” selbst und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst habe, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, den 20. Oktober 2001

Nicolai Savaskan